

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Estudio comparativo de la acción de diversos agentes
morfo genéticos sobre micoplasmas y forma L.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Fernanda García Lavín

Madrid, 2015

María Fernanda García Lavín

TP
1982
195



X-53-225186-4

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACCION DE DIVERSOS AGENTES
MORFOGENICOS SOBRE MICOPLASMA FORMA L.

Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1982



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 195/82

© María Fernanda García Lavín
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1982
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-24228-1982

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
=====

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACCIÓN DE DIVERSOS AGENTES
MORFOGÉNICOS SOBRE MICOPLASMAS Y FORMA L

Tesis presentada para optar al
Grado de Doctor en Farmacia.

Autor:

María Fernando García Lavín.

M a d r i d, 1980.

DR. D. ELISEO GASTÓN DE IRIARTE Y SANCHIZ, CATEDRÁTICO-DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICO:

Que Doña María Fernanda García Lavín, ha realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. D. Lorenzo Vilas y la co-directora Dra. Sacramento Rico, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Farmacia, con el título: Estudio comparativo de la acción de diversos agentes morfogénicos sobre micoplasmas y forma L.

Y para que conste, firmo la presente certificación en Madrid, a



Fdo.: Dr. D. Lorenzo Vilas.

Fdo.: Dr. D. Eliseo Gastón de Iriarte y Sanchiz.

Antes de iniciar la exposición de la presente Tesis deseo expresar mi agradecimiento:

Al Profesor Dr. D. Lorenzo Vilas López, Director de esta Tesis a quien quiero manifestar mi profundo afecto y sincero reconocimiento por el interés y dedicación en el desarrollo de ésta.

Al Profesor Dr. D. Eliseo Gastón de Iriarte y Sanchiz, -- por haber aceptado el ser Ponente de esta Tesis, y por los - atenciones que ha demostrado siempre hacia mí.

A la Dra. Sacramento Rico co-directora de esta Tesis, a - quien nunca agradeceré suficientemente sus consejos y orientaciones, sin cuya ayuda personal me hubiera sido imposible_ realizarla.

También deseo expresar mi agradecimiento al Dr. D. Fernando Baquero y a la Dra. Da. M^{ra}. Antonia Meseguer, por la amabilidad de sus consejos.

Igualmente quiero dar las gracias al Dr. D. César Nombela, a todos los miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, por el apoyo prestado durante todo este tiempo, especialmente a mis compañeras, Dra. Carmen de la Rosa, Dra. M^{ra}. Angeles Mosso, Dra. Felisa Díaz.

Al Dr. D. Miguel Rubio Huertas, Director del Instituto -- Jaime Ferrán, por su ayuda y constantes muestras de interés_

que ha tenido durante la realización de la misma, y al perso
nal del Servicio de Microscopía Electrónica.

Finalmente agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia
por la concesión de la Beca de Personal Investigador, cuya -
ayuda económica ha hecho posible la realización de esta Te--
sis.

I N D I C E

	<u>Página</u>
I INTRODUCCION	2
CONSIDERACIONES GENERALES	2
1. Variación morfológica de los microorganismos	3
2. Evolución de los ciclos de las formas L de las bacterias	4
3. Primeros estudios de cultivos de forma L ..	16
4. Semejanza de síntomas en enfermedades humanas	21
5. Semejanza de síntomas en enfermedades animales y vegetales	28
II. OBJETO DE LA TESIS	33
III. MATERIALES Y METODOS	
MATERIALES	
1. Microorganismos	36
1.1. Micoplasmas	36
1.2. Bacterias	36
2. Animales de laboratorio	36
3. Medios de cultivo	
3.1. Medios de micoplasmas	37
3.1.1. Medios de transporte	37
3.1.2. Medios de enriquecimiento	37
3.1.3. Medios de aislamiento	40
3.1.4. Medios de identificación.....	42

	<u>Página</u>
3.1.5. Medios de conservación	45
3.2. Medios de estreptococos	46
3.2.1. Medios de enriquecimiento	46
3.2.2. Medios de aislamiento e identificación	48
3.3. Medios de cultivo utilizados para Forma_	
L	54
3.3.1. Medios para la inducción	54
3.3.2. Medio de reversión	56
4. Colorantes	56
5. Aparatos	59
 MÉTODOS	
6.1. Métodos para micoplasmas	61
6.1.1. Método de transporte o recogida -	
de muestras	61
6.1.2. Método de aislamiento de micoplasmas	61
6.1.3. Método de enriquecimiento	62
6.1.4. Método de recuento total y via- -	
bles	63
6.1.5. Métodos de identificación	66
6.2. Métodos para estreptococos	85
6.2.1. Método para conservación y trans- porte	85
6.2.2. Métodos de identificación	85
7. Métodos de tinciones	94

	<u>Página</u>
7.1. Tinciones en medio líquido	94
7.2. Tinciones en medio sólido	96
IV. PARTE EXPERIMENTAL	
1. Micoplasmas	102
2. Inducción de forma L.	110
3. Estudios para la comparación entre micoplasmas y la forma L inducida	139
V. RESULTADOS	
1. Micoplasmas	154
2. Inducción de forma L.	177
3. Estudios para la comparación entre micoplasmas y la forma L inducida	193
VI. DISCUSIÓN	228
VII. CONCLUSIONES	249
RESUMEN	253
BIBLIOGRAFÍA	255

I. INTRODUCCION

I.- CONSIDERACIONES GENERALES.

En el amplio campo de la bacteriología se utilizan con frecuencia los métodos de comparación, pues la morfología, biología y clasificación de las bacterias presentan gran diversidad, haciendo surgir dudas y teorías muy dispares.

Hay numerosos casos en los que las diferencias son solo accidentales, según las circunstancias a las que se está sometiendo a aquellos microorganismos, pero en otras ocasiones las semejanzas se mantienen aun variando esos factores.

Así, por tener los microorganismos de nuestro estudio - una serie de características comunes y por encontrar en su - revisión bibliográfica criterios muy dispares, tomamos como tema de nuestro trabajo "Estudio comparativo de la acción de diversos agentes morfogénicos sobre microplasmas y forma L".

Por la amplitud de trabajos encontrados hasta hoy sobre - estos microorganismos, les hemos agrupado en una serie de -- apartados:

1. Variación morfológica de los microorganismos.
2. Evolución de los ciclos de las formas L de las bacterias.
3. Primeros estudios de ensayos de cultivos de forma L.
4. Semejanza de síntomas en enfermedades humanas.

5. Semejanza de síntomas en enfermedades animales.

I. 1.- VARIACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MICROORGANISMOS.

La idea dada por Cohn (1876) y Koch (1876) de que las especies bacterianas eran estables y no cambiaban de forma, es decir, el "monomorfismo", permaneció hasta que, en 1876, Nageli publicó su teoría del "pleomorfismo", en la que consideraba que los diferentes tipos de bacterias pasaban "de una forma a otra" solo variando las condiciones de cultivo.

Rapidamente se vio que estas conclusiones eran el desarrollo de técnicas defectuosas, observándose una variación limitada de formas para todos los microorganismos, según los medios en los que se cultivaban.

Jaime Ferran (1897) suponía que la forma normal del bacilo de Koch era solo un período o fase evolutiva del microorganismo. Observó la polimorfia o diversidad de formas de este bacilo: formas bacilares, granulosas, ramificadas, etc.

Hort (1917), Almquist (1918) y Mellon (1925) describen -- formas bacilares normales en un mismo cultivo, junto a las formas complejas de las especies bacterianas, tales como gránulos pequeños, formas difteroides y cocoides gigantes, presentes en un mismo ciclo vital.

Así, se llegó a ver cómo bajo la influencia de determinadas sustancias y en condiciones diferentes, los microorganismos presentan morfologías distintas de las consideradas nor-

"

males.

I. 2.- EVOLUCIÓN DE LOS CICLOS DE LAS FORMAS L DE LAS BACTERIAS.

Klieneberger-Nobel, en 1935, observó en los cultivos de Streptobacillus moniliformis encontrados en rata, unos organismos muy diferentes de las bacterias normales, tanto por sus dimensiones como por los caracteres de sus colonias, pero que tenían gran semejanza con los del agente de la pleuroneumonía, denominándolas "Pleuropneumonia like- organisms" (PPLO).

Al conjunto de estas formas les dio el nombre de "L", término del que luego surgieron L₁, L₂, etc., en homenaje al "Lister Institute", donde ella trabajaba.

Más tarde, consiguió aislar un cultivo puro de estos microorganismos y creyó que se trataba de gérmenes específicos que vivían en simbiosis con las bacterias normales.

No obstante, Dienes demostró en 1939 que las colonias "L" del cultivo bacteriano obtenido por Klieneberger, eran solamente un estado particular de estas bacterias en un momento evolutivo y que eran capaces de multiplicarse o pesar de las variaciones sufridas.

Dienes y Smit (1942) demostraron la presencia de formas parecidas en cultivos de Escherichia coli, Haemophilus influenzae y parainfluenzae, pero no lograron aislar estas for

mos.

Comprobaron la semejanza con las observadas en la pleuro-neumonía de los bóvidos. Por ello denominaron a esta forma - de crecimiento bacteriano atípico "Forma L ó Fase L".

En 1942, Pierce demostró que las formas L del Streptobacillus moniliformis eran muy resistentes a la penicilina, mientras que las formas normales eran muy sensibles a este antibiótico, propiedad de gran importancia para la identificación de estos microorganismos.

Los mecanismos condicionantes de los cambios que dan lugar a modificaciones morfológicas, fueron dados primeramente por Dienes (1947), afirmando que por adición a los medios de cultivo de cierta cantidad de penicilina, variando la concentración de agar, suero, etc., se observaba la aparición de formas L.

Otros investigadores encuentran como agentes inductores: - el frío, la lysozima, antibióticos, etc.

Así, la bacteria sometida a estos agentes acaba por morir de no tener unos medios de defensa capaces de sufrir modificaciones y hacerse insensible a los agentes nocivos.

Es a partir de este momento cuando se realizan más estudios sobre modificaciones de los microorganismos, considerándose a estas formas, por una parte, como un estado o fase especial de las bacterias y, por otra, realizando estudios de la gran semejanza de estos organismos modificados con los mi

croorganismos productores de determinadas enfermedades humanas y animales, como ya veremos.

Diversas interpretaciones de los ciclos L.

En la descripción e interpretación de las distintas fases de los ciclos existen diferencias de unos autores a otros.

Bordet (1910) describe la evolución de las formas L en el Streptobacillus moniliformis de esta manera: Hinchazón progresiva del bacilo que se redondea y adquiere el tamaño de -- unas 10 a 20 micras, dando lugar a unos cuerpos globosos, -- que dan lugar a las modalidades siguientes:

- 1º Situación. Formación de gránulos que rellenan la forma gigante.
- 2º Situación. Formación de una estructura bacilar (tipo difteroides) en el interior de la forma gigante.
- 3º Situación. Se vacuoliza el cuerpo globoso y se autoliza.

Así se llegó a estas conclusiones:

1º.- La forma gigante del Streptobacillus moniliformis se reproduce por escisiparidad.

2º.- Reproducción por formación de gránulos que dan de nuevo la bacteria original.

3º.- Reproducción por formación de formas globosas (ciclo verdadera). Si las formas gigantes no se lisan, quedan repletas de gránulos que se liberan por roturas de aquéllas.

La fase L, según Borrel "representa una posición de repliegue de la bacteria ante condiciones ambientales desfavorables." "Las bacterias pueden recobrar su forma originaria -- por circunstancias desconocidas que todavía no sabemos imitar, pero pueden también permanecer indefinidamente en dicha fase L, en cuyo caso, se ha transformado un microorganismo -- en otro organismo autónomo, morfológica y biológicamente distinto, cuya importancia en patología humana no se puede menospreciar."

"Debemos preguntarnos si los especiales tipo L aislados -- del hombre son realmente Pleuroneumoniales o fases L de -- otros microorganismos que han olvidado su origen."

En 1950 y 1951 Tulasne observa la obtención y posible reversión de las formas L de las bacterias normales y da las -- primeras condiciones para la obtención de forma L. Indica -- que las muestras deben de ser tomadas directamente de organismos infectados o de colecciones, pasándolos por animales -- sensibles en determinadas condiciones.

Afirma la necesidad de encontrar una consistencia del medio, adecuada para cada especie, y usa por primera vez la penicilina como agente inductor.

En sus descripciones, afirma que las colonias de forma L -- son análogas, desde todos los puntos de vista, a las colonias observadas en los cultivos de microorganismos que producían -- la pleuroneumonía de los bóvidos y a los que los anglosajos --

nes denominaron Pleuroneumonie-like-organism (PPL0), pasan--
do él a denominarles "organisms du tipe de la pleuroneumonie"
(OTPP).

Así, en esta época, nos encontramos la escuela inglesa --
con Klieneberger-Nobel y Edward que separan claramente los -
Pleuroneumoniales y las formas L.

En la escuela francesa Tulasne y col. obtienen las formas
L bacterianas reversibles, las bacterias de origen y las for-
mas L fijas, sin poder marcar límites en estos poses. Son --
formas L y pleuroneumoniales con origen común pero no se po-
día demostrar el origen bacteriano de los pleuroneumoniales.

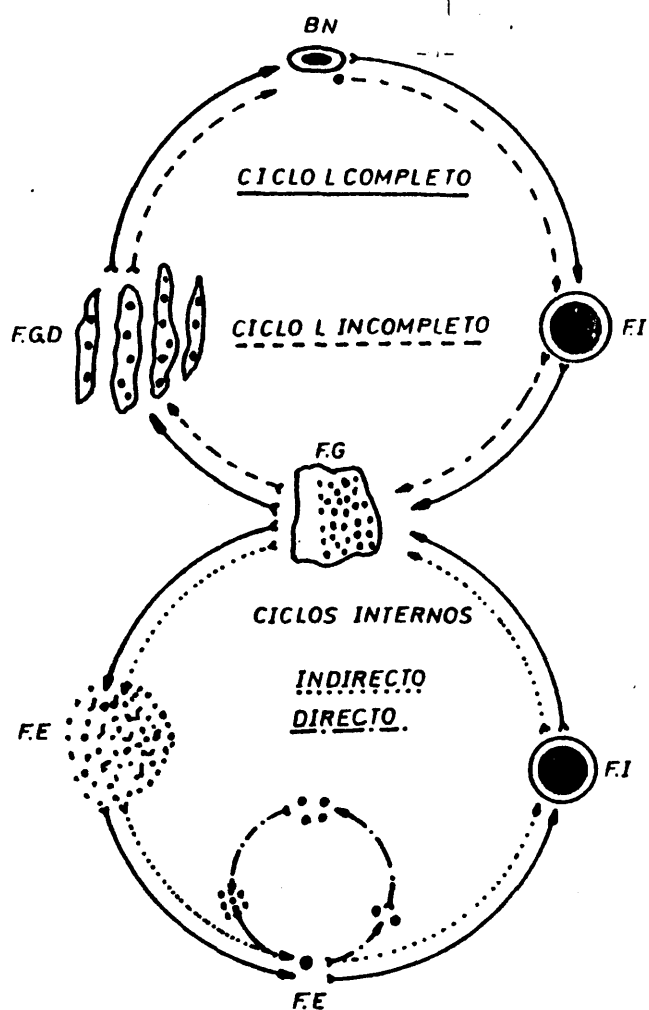
Dos años más tarde, Tulasne (1953) establece el ciclo evo-
lutivo completo de estas formas, denominándole "ciclo L".

Define los ciclos L, como "las modificaciones que sufren_
las bacterias normales para transformarse en formas gigantes
primero, después en forma enana y finalmente pasar a bacte--
rias normales, cuando las circunstancias lo permiten."

Según este autor el ciclo puede ser completo, incompleto_
e interrumpido. Dibujo.

Ciclo L completo: un microorganismo normal se transforma_
en una forma gigante (tamaño de un gran leucocito mononuclea-
do de la sangre); la forma gigante genera granulaciones vi--
vas filtrables y capaces de reproducirse: son las formas ena-
nas de las bacterias.

Estas formas enanas revierten a las formas bacterianas --



Representación esquemática del ciclo L, según Tulasne.

BN= bacteria normal

FI= forma intermedia

FG= forma gigante

FGD= forma gigante dividida

FE= formas enanas

(Citología bacterica, Congreso Internacional de Microbiología, Roma, 1953)

normales.

Ciclo L interrumpido: ocurre cuando la acción nociva actúa por un tiempo relativamente largo sobre la bacteria. Las formas gigantes pasan a enanas, pero éstas pierden la facultad de dar origen nuevamente a formas normales y las formas enanas se reproducen indefinidamente bajo esta forma, originando así variantes enanas distintos de las bacterias.

Ciclo L incompleto: Tiene lugar cuando las bacterias sometidas a acciones nocivas ligeras o temporales, pasan únicamente a formas gigantes, que, a su vez, pueden dividirse, pasando a formas gigantes o formas normales, sin que se manifieste la aparición de formas enanas.

Las nociones de formas L pueden ser directamente relacionadas, desde final del siglo pasado, con las formas "atípicas" de los microorganismos. Metsnikoff en 1888, ya había observado en cultivos del Mycobacterium tuberculosis, sobre suero, formas cocoides más o menos alargadas y ovoides o en formas de lanceta; morfología semejante a las formas L, descritas más tarde por Nocard y col. en 1898, y que igualmente Xalabarder (1953) vio en cultivos sobre suero del bacilo tuberculoso, condición que se consideraba esencial para el cultivo del grupo de las pleuropneumoniales.

La transformación de formas bacterianas normales en formas gigantes que liberan rápidamente formas enanas, fue estudiada

diada por Dienes (1947) mediante tinciones "in situ" sobre agar; por Tulasne (1953) en Proteus y por Madoff y Dienes en 1958.

Así, para Tulasne y Klieneberger-Nobel, estos microorganismos se caracterizaban por tener dimensiones de 125-200 μ m, ser toscamente esféricos, pasar a través de filtros, que retienen las bacterias, ser insensibles a la penicilina y no poseer membrana.

Respecto a esta última propiedad, Rubio Huertos y Moreno San Martín (1953), mediante observaciones efectuadas en el microscopio electrónico, demostraron que presentaban parte de membrana, afirmando la existencia de flagelos en los casos de Proteus vulgaris y Pseudomonas fluorescens.

Rubio Huertos realizó (1954) la inducción del ciclo L utilizando cultivos con penicilina 5.000 a 10.000 U/c.c. ó glicocola al 1 ó al 10 %, según la bacterio, observando que mueren numerosas bacterias, se lisan al poco rato de la adición del antibiótico.

Algunas adquieren tamaños mayores que la forma habitual y en ocasiones presentan grandes longitudes, haciéndose más transparentes como filamentos menos coloreables que no se dividen, como ya fue observado por Klieneberger-Nobel.

Por rotura de la membrana, las formas L grandes liberan formas filtrables que poseen un citoplasma envuelto en una membrana, el centro aparece más opaco, como un núcleo; esto

"

estó demostrado por Rubio Huertos en microfotografías electrónicas, observando, además, varios planos de la forma globuloso, abultamientos del plasma, apareciendo cadenas de bacilos normales; afirmando que el peso de la forma L grande o lo normal depende del tipo de bacteria y del medio de cultivo utilizado. Dibujo

Otra manera de evolución del ciclo L fue la observada por Borrel y col. (1910) en la que establecen el ciclo evolutivo de Pleuroneumonia bovis, de la forma siguiente: Dibujo.

1ª situación: Aparecen gránulos elementales y se presentan dos estados:

- a₁) Estado filamentososo.
- a₂) Estado de ramificación.

a₁) Estado filamentososo. El volumen de los gránulos aumentan y se generan esferoides.

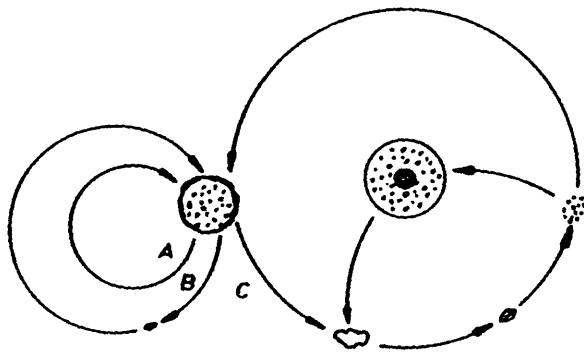
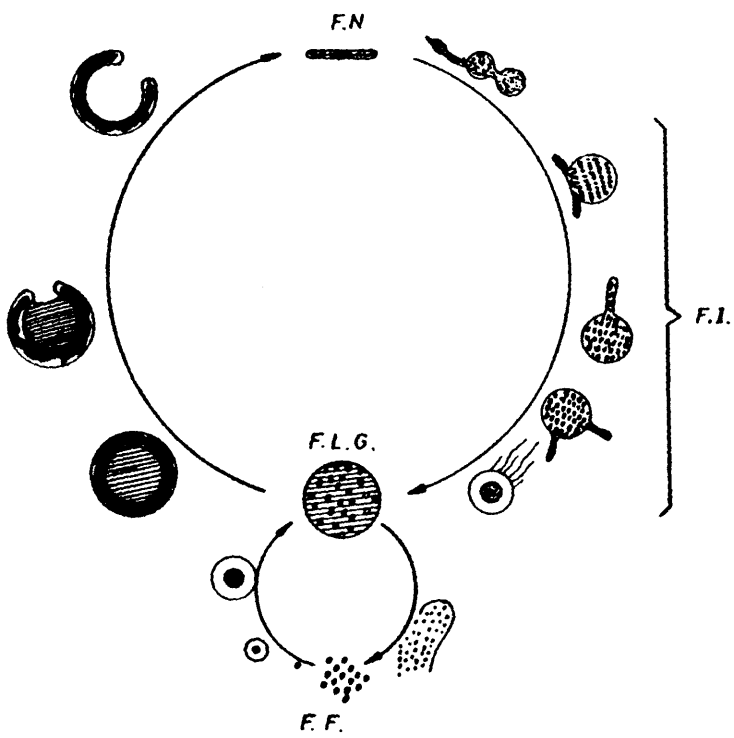
De estos esferoides nacen una o dos gemaciones y al separarse quedan unidas por filamentos muy tenues.

Estos filamentos, al contrario de los gránulos, se tiñen defectuosamente con Giemsa.

a₂) Estado de ramificación. Los gránulos condensados en el interior de aquellos filamentos le dan aspecto de cadenas de estreptococos.

2ª situación: Gránulos elementales y formación de esferoides, los cuales se rodean de una masa protoplásmica que por

Ciclo L. propuesto por Rubio Huertos



Ciclo del Str. moniliformis

fragmentación del esferoide se llena de gránulos elementales.

3º situación: Autólisis de las formas ovoides.

Las formas bacilares o filamentosas se hinchan para dar lugar a una forma redondeada que se autoliza rápidamente.

Se forma una especie de ampolla vacía, en cuyo interior, por segmentación o germinación, nacen nuevos gránulos o filamentos.

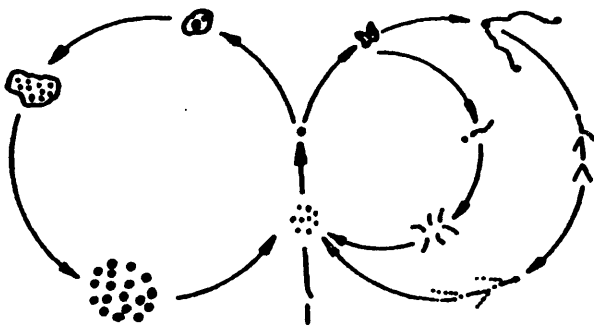
Es por rotura de esas ampollas por donde se liberan las neoformaciones.

Dienes y Weinberger (1951) determinaron que la única diferencia entre las formas L obtenidas en el laboratorio a partir de diferentes cepas, utilizando como agente inductor la penicilina, y las aisladas en la naturaleza, era que en este último caso la especie bacteriana es de origen desconocido.

Por todo ello, surge una gran diversificación de opiniones con respecto a estas formas, introduciendo Tulasne y Bringmann (1952) un nuevo término: Forma M (o ciclo L incompleto) y forma L verdadera; pero esta distinción entre "forma M y forma L" no fue admitida por diversos autores.

Estas transformaciones solo se habían logrado en medios sólidos, y fue Carrere (1952) el que obtuvo la forma L, por primera vez, en medio líquida.

Tulasne y Bringmann confirmaron haber obtenido una forma L estable de Proteus, dando un método para la observación de la morfología de formas L al microscopio electrónico; formas



Modos de reproducción del Pleuroneumonia bovis

que habían sido obtenidas en medio sólido por la acción de la penicilina a partir de Proteus morgani.

I. 3.- PRIMEROS ESTUDIOS DE CULTIVOS DE FORMA L.

Los estudios de cultivos de formas L surgen con gran diversidad y proliferan rápidamente para determinar las condiciones idóneas de inducción, identificación y clasificación de las formas obtenidas.

Minck y Minck (1951) afirman que por medio de inoculación de formas bacterianas en embrión de pollo, obtienen forma L de la bacteria original, dependiendo los resultados de la vía utilizada.

Demostraron que la inoculación de una suspensión bacteriana en alantoide de embrión vivo produce la muerte del embrión. Pudiendo obtenerse las formas L en subcultivos de alantoide pero no les fue posible llegar a recuperar la forma bacteriana originaria.

La inyección en la cavidad vitelina de embrión vivo provoca generalmente la muerte del embrión, y por cultivos sucesivos se encuentran formas L en el saco vitelino.

Mitchell y Moyre (1956) comprobaron que las variantes de forma L de los microorganismos Gram-negativos eran mucho más estables que los Gram-positivos, debido a que la presión celular interna es mayor en los Gram-positivos.

Esto hace que el grado de estabilización de la forma L de penda en gran manera del organismo de origen del que se par- te para la inducción

Lavillaureix (1956) obtuvo formas enanas en un medio sóli do penicilinado y enriquecido con abundantes sales minerales.

Shepard (1956) afirma la existencia de unas formas denominadas T, más pequeñas que las L, de unas 10 micras de diáme- tro, que presentan una forma rugosa más o menos irregular.

Encontró estas formas T en un caso de uretritis no gonocó- cica y comparó estas colonias con las encontradas para los - organismos de la pleuroneumonía.

En 1961 Deparis y col. encuentran en muestras de enfermos de cardiopatías febriles, endocarditis bacteriana aguda, reu- matismo articular, etc., que los cultivos normales se presen- taban como negativos por no encontrar la bacteria "clásica", pero al utilizar una técnica denominada "ovohemocultivo" - - eran capaces de evidenciar formas estreptocócicas después de algunas resiembras, aunque se presentaban como masas globo- sas, con una gran tendencia a lisarse rápidamente.

Existía, por tanto, la posibilidad de cultivar sobre hue- vo esas masas globosas, dudosas por su polimorfismo, apare- ciendo en cultivos repetidos formas estreptocócicas o estafi- locócicas que habían pasado desapercibidas por no encontrar- se en su forma morfológica clásica.

Sharp (1954), induce formas L a partir de estreptococos -

del grupo A observando mediante la utilización de 16.000 U/c.c. de penicilina y fosfatos las distintas influencias del medio.

Rotta y col. (1965), aislaron forma L en cultivos de estreptococos creciendo en placas de agar con distintos gradientes de antibióticos, así los gradientes de 500 U/c.c. de bacitracina y 100 U/c.c. de penicilina destacaron como idóneos.

Realizando el estudio con 18 cepas, para llegar a resultados positivos de forma L en 7 casos, dieron 15 pases o cultivos sucesivos con los agentes inductores.

La estabilidad de estas formas L fue dada por el hecho de que, después de los pases continuos sobre placas sin antibiótico, la reversión a las formas bacterianas de origen no se producía.

Todo ello fue el primer paso para demostrar la posibilidad de obtener, a nivel de laboratorio, las formas estables, obtenidas por la acción de agentes inductores que actuaban sobre la pared celular.

La primera vez que aparece un método comparativo para la preparación de muestras de forma L y micoplasmas fue en 1964, cuando Domermuth y col. describieron un método para la preparación de muestras y su observación al microscopio electrónico; llegando a la afirmación de que no existían diferencias estructurales notables, como para establecer una diferencia total entre micoplasmas y forma L.

Esta afirmación marcó el punto de partida para numerosos trabajos en los que los términos formas L y micoplasmas aparecen juntos.

Así, en la realización de pruebas biológicas, Schmith y col. (1967), inoculan formas L de estreptococos del grupo A en ratones, por vía intraperitoneal, para comprobar los efectos patogénicos y sintomáticos y compararlos con los que se presentaban en el caso de identificación biológica de micoplasmas.

Estudios más recientes permiten la utilización de métodos para demostrar las afirmaciones anteriores y para realizar identificaciones.

Así, Kagon en 1971, confirma los estudios de identificación para forma L y micoplasmas en muestras patológicas, como ya había descrito en 1963 Nonnett, y observa las formas filamentosas de micoplasmas de Brett (1969) estableciendo semejanzas de estos microorganismos que desde 1969 había notado Hayphick.

Se comprueba lo demostrado por Klieneberger-Nobel para Streptobacillus moniliformis y para Salmonella Typhi y Proteus por Dienes, afirmando la existencia de una aglutinación cruzada entre la bacteria y su forma L, y se demuestra que las tasas de aglutinación del suero aglutinante son menos elevadas para las formas L que para la forma normal correspondiente.

Así, la pérdida total del antígeno H y la disminución progresiva de los factores antigénicos O, que tiene lugar a veces en las resiembras sucesivas de las colonias L y tal vez en las inoculaciones animales, explica la posibilidad de encontrar o no el parentesco antigénico que existe entre las formas L y los gérmenes de origen, dependiendo pues del momento constitucional de esa forma o mejor aun de la naturaleza de ese microorganismo al que se le está sometiendo a cambios estructurales.

Rubio Huertos (1954) demostró que las formas L obtenidas pierden la patogenidad que se observa en las bacterias de origen. En 1964 Alonso realiza un estudio serológico del género micoplasma.

La utilización de gel de poliacrírido permitió a Theodore y col. (1970) la identificación de formas L y micoplasmas humanos.

Para Kunze (1972) las formas L son modificación de las células bacterianas; en el material clínico se presentan las llamadas formas de transición (esferoplastos, protoplastos) las cuales se supone se originan mediante inductores lesionantes de las paredes celulares, principalmente antibióticos.

Los microorganismos inducidos no son patógenos, de tal manera que al desaparecer la terapéutica, que en este caso está haciendo de agente inductor, los microorganismos retornan a bacterias de origen, vuelven a ser patógenos y la enferme-

dad se recrudece.

Muelas y Ales (1973) establecen un método para obtener fotografías de forma L y micoplasma en relieve, con el microscopio ordinario, por medio de la utilización de luz oblicua.

Rubio Huertos, Beltró y Santaolallo (1972), inducen tejidos tumorales, por la acción de fase L de Agrobacterium tumefaciens en Phaseolus vulgaris y admiten la posibilidad de -- que los micoplasmas sean las formas L espontáneas de bacterias patógenas de las plantas.

Dracch, Schmitt y Slomska (1973), demuestran la acción -- bactericida de las células fagocíticas de la sangre humana, sobre las formas L de estreptococos del grupo A; siendo éste un paso muy importante, por ser más tarde identificadas numerosos formas L en las zonas de tumoración y en las alteraciones hemáticas de naturaleza leucémica, como ya explicaremos.

I. 5.- SEMEJANZA DE SINTOMAS EN ENFERMEDADES HUMANAS.

En las citas de diversos autores nos encontramos una serie de enfermedades o mejor aún de epidemias con gran semejanza de síntomas, a las que a través de los años se las fue denominando con gran diversidad de nombres, pues los trabajos de laboratorio agrupaban y clasificaban los microorganismos encontrados según las diferentes técnicas.

Por ello quisimos mencionar aquí esta variación de términos y conceptos que podían estar íntimamente relacionados --

..

con variaciones morfológicas encontradas en estos microorganismos.

El primer micoplasma humano aislado fue a partir de pus - de un absceso situado en la glándula de Bartholin, en 1937, - por Dienes y Edsall.

Reiman (1938) agrupa por primera vez una serie de enfermedades a las que se les dio una etiología vírica y se las denominó con el término de "neumonía atípica", separándolas de las de origen gripal, psitacosis y fiebre Q, que se identificaron y reconocieron como responsables de un pequeño número de neumonías.

Esta denominación desafortunada de "neumonía atípica" mereció la aprobación Oficial (Official Statemants, 1942).

La guerra de 1939-45 ofreció una buena oportunidad para estudiar esta enfermedad, que se encontró ocurría con mayor frecuencia que las demás formas de neumonía bacteriana ya perfectamente determinadas.

Así, Peterson y col. (1943), encuentran un grupo de enfermos con neumonía atípica primaria que presentaban aglutininas al frío durante el curso de su enfermedad.

Se consideró por ello que este tipo de neumonía era claramente epidemiológica y el método de las aglutininas al frío pasó a ser el método de diagnóstico.

En 1943 se aisló un agente filtrable en los enfermos con neumonía atípica primaria y aglutininas al frío positivas, y

fue inoculado con éxito en ratas y conejos de indios, que -- desarrollaron neumonitis en un número elevado de casos.

Esto fue comprobado por Eaton y col. en 1944.

Por ser filtrable y realizarse su cultivo sobre embrión - de pollo, el agente de estas pleuroneumonías fue confundido_ con un virus, hasta que en 1950 se comprobó ser susceptible_ a algunos antibióticos.

Con técnicas de inmunofluorescencia se visualizó y se cul_ tivó en embrión de pollo y se supuso era el mismo agente que había provocado una epidemia de neumonía entre escolares.

En 1957, Liu, confirma la existencia de este agente al mi_ croscopio electrónico en muestras pulmonares que se creían - afectados por agentes víricos.

A partir de este momento unas variaciones de los términos de denominación y clasificación es lo que llevó a la apari-- ción de una serie de denominaciones en enfermedades con los_ mismos síntomas y tratamientos.

Edward y col. (1967) proponen el término PPLO en lugar de micoplasmas para todos estos microorganismos.

Marmion y Goodburn descubrieron en 1961 que el denominado agente Eaton era un micoplasma y se le propuso la denomina-- ción de Mycoplasma pneumoniae.

Cuando Chanok y col. (1963) cultivaron en medio acelular_ este agente, es cuando surgió su clasificación dentro del gé_ nero micoplasma, encuadrando dentro de esta denominación a -

microorganismos de las mismas características.

En 1963, Taylor-Robinson y col. aislaron el Mycoplasma -- Oral tipo 1 a partir de cultivos celulares y dan los métodos de fijación de complemento en gel de difusión.

El Mycoplasma hominis tipo 1 fue aislado por Taylor-Robinson y col. en 1965 y se consideró saprofita de la garganta.

Hayflick y Chanock (1965) demuestran la falta de pared celular, su resistencia a la penicilina y su sensibilidad a -- concentraciones pequeñas de tetraciclinas, base de los tratamientos médicos en estos tipos de infección.

En 1964-65 Grayston y Jansson encuentran en estudios epidemiológicos que, por término medio, el Mycoplasma pneumoniae es el responsable del 30 % de las neumonías atípicas en la población normal y quizá sea el 10 % de todas las neumonías.

Sohier (1964) en su diagnóstico de las enfermedades producidas por virus incluye también los métodos de diagnóstico a utilizar para el caso de los micoplasmas.

Perol (1967) describe dentro de la patología humana las enfermedades íntimamente relacionadas con las infecciones -- por micoplasmas, en especial por el Mycoplasma pneumoniae.

Hayflick y Koprowski (1965) aislaron sobre medio de agar por cultivo directo de una médula leucémica, una cepa de Mycoplasma oral tipo 1. Así la lista de micoplasmas dada en -- 1965 por Hayflick y aumentada en 1967 por Edward, era conti-

nuamente modificada.

Barile y col. (1966) logran aislar M. orale en cultivo directo de células leucémicas.

Durante unos años, diversos autores coinciden en encontrar unos agentes a los que se les clasifica como causantes de abortos y tumores. En 1967, Jones encuentra Mycoplasma hominis en abortos; Weissenbacher (1969), demuestra la presencia de micoplasmas y formas globosas modificadas en carcinoma de útero. No encontrándose micoplasmas en las muestras de sangre de estos enfermos, de tal manera que al ser extirpado el tumor no se logra aislar ninguno de estos microorganismos, lo que parece demostrar su presencia únicamente en el tumor en sí. Esto es nuevamente remarcado por Drasch y col. (1973) al afirmar la presencia de formas L de streptococcus del grupo A, semejantes a los micoplasmas, en zonas tumorales.

Actualmente existen numerosas citas en las que las formas L y los micoplasmas son acusados de numerosas alteraciones en el tramo génito-urinario, así Gallagher y col. (1970) describen la presencia de esferoplastos en infecciones urinarias.

Los micoplasmas de localización génito-urinaria son estudiados en 1967 por Card, y en este mismo año Harwicks y col. relacionan estos microorganismos con la posibilidad de abortos.

Iguolmente las técnicas de diagnóstico fueron evolucionan

do de una manera rápida, y en 1975 Muelas observa en cultivos celulares, formas cocoides deformadas, con granulaciones que al teñirlos con naranja de acridina se tiñen de verde y resaltan sobre los demás componentes internos de la célula.

Insistimos en que la semejanza de síntomas de algunas enfermedades humanas dio lugar a una clasificación de términos y técnicas muy heterogéneas.

El Mycoplasma hominis tipo 1 ha sido aislado de abscesos - de la trompa o del ovario, mostrando anticuerpos específicos, de hemocultivos positivos en el curso de síndromes febriles en postpartum o post-aborto con aumento de anticuerpos. Se - aísla también de los fetos después del aborto.

Este micoplasma se aisló en pacientes en las que se había presentado el aborto, y el 29 % de ellos presentaban el anticuerpo con títulos de 1/5 al 1/40.

Solo en una paciente se observó el anticuerpo de inhibición de crecimiento.

Pero este poder patógeno no puede ser afirmado de una manera absoluta, ya que también se aísla de la cavidad bucal - de sujetos sanos.

Por ello Shepard (1969), afirma que el Mycoplasma hominis tipo 1 es un saprofita frecuente de las mucosas génito-urinarias que puede llegar a ser patógeno en determinadas circuntancias (infección bacteriana anterior), llegando a modificar el pH vaginal, que se transforma en alcalino.

La primera vez que se aislaron Mycoplasmas cepa T fue en

1969 cuando Shepard les identifica a partir de exudados de -
pacientes con uretritis no gonocócica, sugiriendo Kundsín --
(1974) que la mujer actúa como portadora asintomática dando -
lugar a la infección por intercambio sexual. Denominándoles -
Cepa I (Tiny) ya que sus colonias presentaban 15-25 micras de
diámetro.

La relación entre aborto, esterilidad y la presencia de -
Mycoplasma hominis, y sobre todo de Mycoplasma cepa I, Urea-
plasma urealiticum (denominación que proviene de producir --
una ureasa con liberación de amoníaco y CO₂. Tal vez por esa
producción de amoníaco posee la propiedad de atacar los célu-
los), está demostrada por Foy y col. en 1970, encontrando --
cultivos y pruebas serológicas positivas en muestras de moco
cervical en estudios en University of Washington Hospital.

En 1976 Knudsín denominará a estos microorganismos Urea--
plasmas urealiticum.

Gregory y Payne en este mismo año, demuestran la presen--
cia de Mycoplasma hominis tipo 1, Mycoplasma fermentans y --
Mycoplasma orale tipo 2, como causa de infecciones en las cé-
lulas del cuello uterino.

En 1972 y 1973 Friberg y Gnarpe afirman la existencia de -
la infección por Mycoplasma cepa I como causa de la "inferti-
lidad" y la conveniencia con doxiciclina para resolver este -
problema.

Stray-Pedersen y col. (1978) obtienen mediante biopsia, te

jido de endometrio que al ser cultivado en medio específico_ de micoplasmas, muestra cómo además de la flora urogenital - (staphylococos, enterococos, colibacilos, streptococos alfa_ y beta hemolíticos, etc.) se presentan los micoplasmas en un 28 % de los casos de aborto y en un 50 % de las mujeres esté_ riles, observando el desplazamiento de estos microorganismos desde la cavidad uterina hasta olojarse en el tejido del en- dometrio.

Estos autores convienen como los anteriores, en la utili- zación de la doxiciclina para la erradicación de Mycoplasma - cepa I del endometrio.

El Mycoplasma fermentans apareció en numerosos uretritis_ y en vulvo-vaginitis y lesiones gangrenosas, pero no se ha - logrado aislar en las uretritis no específicas. Las colonias en este caso aparecen en células epiteliales de uretra que - contenga inclusiones citoplasmáticas.

I. 5.- SEMEJANZA DE SÍNTOMAS EN ENFERMEDADES ANIMALES Y VEGE_ TALES.

Los primeros datos son de 1654, en una pleuroneumonía con_ tagioso de las cabras, debida al Mycoplasma mycoides, locali_ zada en Argelia.

Nocard y Roux (1898) estudiando la pleuroneumonía de los_ bóvidos, enfermedad conocida desde el siglo XVII, encontra-- ron en el líquido pleural de estos animales unos microorga--

nismos hasta entonces desconocidos, inmóviles, de pequeño tamaño y gran pleomorfismo, propiedad debido a la carencia de pared celular, lo que les diferenciaba de las bacterias típicas.

Una descripción más precisa de este género fue dado por Borrel y col. (1910) definiendo sus condiciones de cultivo, y demostrando que no se trataba de un vibrión o espirilo como se pensaba, y por su morfología se le denominó Asterococcus mycoides.

Un segundo género de este grupo fue dado por Bridre y Donatien (1923) afirmando que la agalaxia era provocada por un género muy parecido al de la pleuroneumonía de los bóvidos - (Anulomyces agalactiae), presentando las mismas características morfológicas y biológicas.

Shoetensack (1934) logró aislar cepas de micoplasmas de perro.

Laidlaw y Elford (1936) e independientemente Seiffert - (1937), observaron y aislaron micoplasmas en aguas residuales.

La definición dada por Sabin (1941) se aplicó por igual para los PPL0 que para los microorganismos de Nocord y Brebre "Organismos capaces de crecer en medios de cultivo desprovistos de células vivas, dando lugar a estructuras polimorfas que son glóbulos, filamentos y cuerpos elementales filtrables, de 125 a 250 μ m de tal manera que sobre medios

adecuados desarrollan colonias de 10 a 25 μ m de diámetro." - Así, todos estos microorganismos abarcaban el género *Asterococcus* dado por Borrel.

Longley (1951) realizó la transmisión de la enfermedad -- por contagio entre las cobras, demostrando así que la infección natural era altamente contagiosa.

Bridre y Donatien (1923) ya habían visto este contagio de la ogalactia contagiosa, pues habían observado elevados niveles de infección en Francia, Italia, Suiza y Argelia.

Nuevos micoplasmas fueron identificados, y así, en 1956, - Adler observa el *Mycoplasma meleagridis* relacionado con la - aeroculitis de los pollos, y en 1958 establece unos métodos para aislamiento e identificación de estos micoplasmas.

En 1960 se aislo el *Mycoplasma synoviae* por Chalquest y - Fobricont, comprobando en 1967 Dierksy y col. lo identifican serológicamente determinándole como responsable de la sinovitis infeccioso.

Roberts (1964), aislo nuevamente el microorganismo productor de la aeroculitis en pavos. Demostrando que este microorganismo es patógeno solamente cuando la manada se debilita por otra causa, coincidiendo así con otros autores que afirman que existen factores activantes o predisponentes que -- afectan a la severidad de la infección.

La forma de la infección parece probable que sea la transmisión del agente patógeno a través del huevo.

Su aislamiento de las vías respiratorias indica que la -- contaminación orol tiene su importancia.

Según Mare y Switzer (1965 y 1966) el agente de la neumonía vírica del cerdo atraviesa membranas de filtros de poro_ de 300 milimicras, pero es retenido por 220 milimicras. Con_ el exámen de cortes teñidos por Giemsa, descubrieron pequeños organismos cocoides que ocasionalmente son cocobacilares o - anulares. Mare y Switzer denominaron a este agente Mycoplasma hyopneumoniae.

En una reunión de Patólogos de avicultura celebrada en -- 1968 en Princenton, New Jersey (Estados Unidos), Olson afirmó que el Mycoplasma synoviae se encuentra en el aparato digestivo, aunque como todos los demás micoplasmas tienen también tendencia por el tramo respiratorio, órganos reproductores y membranas sinoviales.

Nuevos micoplasmas fueron determinados, como por ejemplo, para el cerdo:

M. hyorhinis, Switzer, 1955.

Cepas tipo B, Dinter y col., 1965.

Minck y col. (1960) inocularon por vía mamaria numerosos_ microorganismos de estos tipos en vacas sanas, bajo la forma de cultivos liofilizados suspendidos en 0,5 c.c. de agua destilada estéril. Encontraron el desarrollo de típicas mastitis por micoplasmas, con las características que se producían en casos de mastitis por Mycoplasmas bovigenitarium y -

"

su relación con la patología humana.

También con el Mycoplasma gallisepticum se ha logrado el desarrollo de una mastitis pero con carácter transitorio, -- viéndose que este micoplasma no llega a multiplicarse en el sistema canalicular de la mama de la vaca.

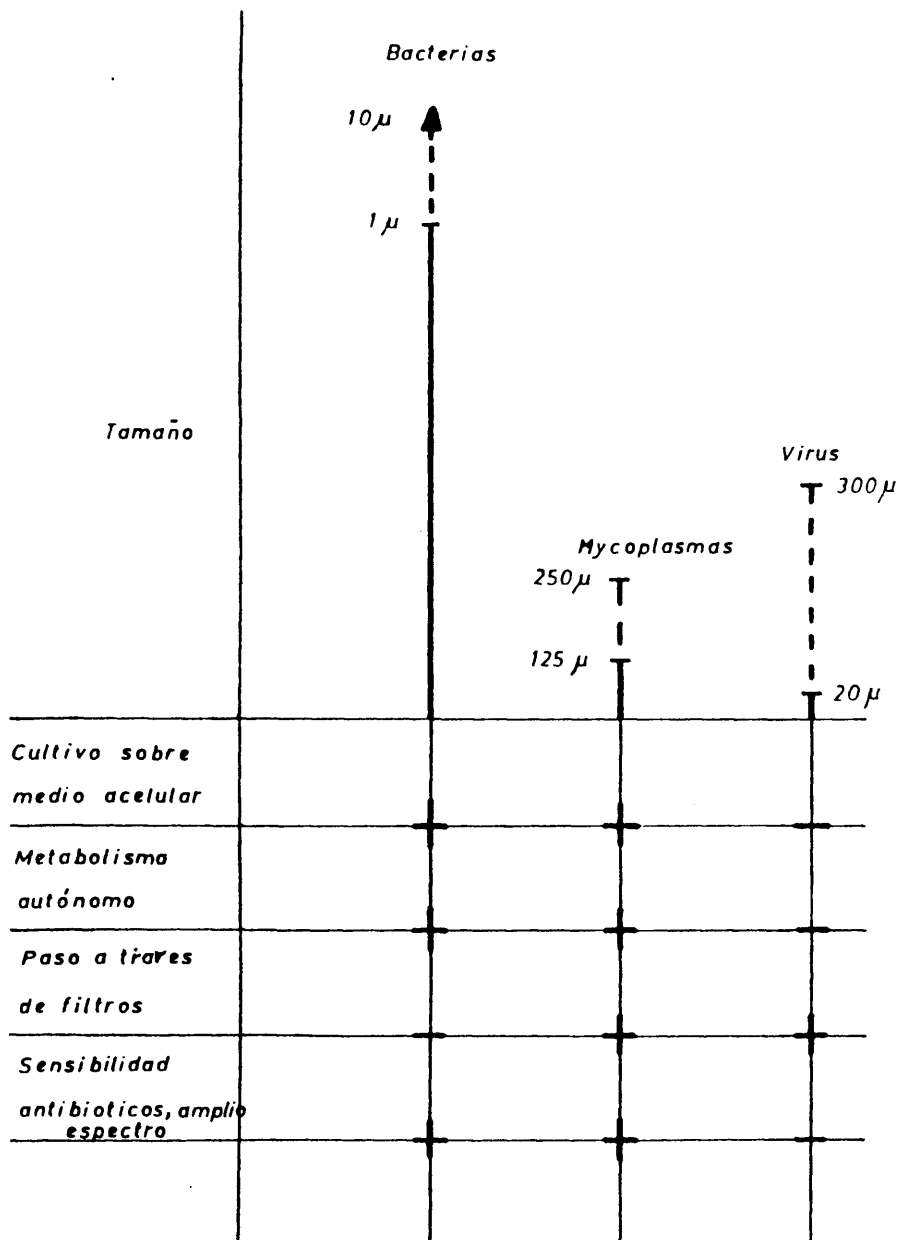
Wilson (1971) logra aislar formas L de Streptococcus agalactiae causantes de mastitis en ganado bovino.

En 1974 Henning enumera las propiedades y métodos de cultivo de muestras obtenidas en raza bovina para determinar la presencia de micoplasmas y acholeplasmas.

En el reino vegetal nos encontramos las citas de Vila Aguilar, que en 1967 observa la clorosis y enrollamiento de cítricos y albaricoqueros, el árbol muere en 1 año presentando -- floración muy temprana y los frutos escasos y rotos. Logra -- aislar micoplasmas vegetales, en estas hojas muy grandes y -- enrollados en forma de cucharo. En las ramas en forma de "escoba de bruja" encuentra menor número y realiza cultivos con las hojas trituradas.

Llego a titular los sueros obtenidos de los árboles, encontrando 1/16 como cifra de árbol sano y 1/256 enfermo.

Mediante la inmunofluorescencia observa que en plantas sanas no aparecen los micoplasmas.



Caracteres diferenciales entre bacterias
mycoplasmas y virus.

II. INTERES Y OBJETO DE LA TESIS

En nuestra tesis nos hemos propuesto contribuir al estudio de establecer la diferenciación de micoplasmas y forma L de Streptococcus viridans, dada la frecuente coexistencia de estos microorganismos en muestras patológicas.

Para ello, comenzamos con este estudio bibliográfico en el que reunimos, dentro de la amplia extensión del tema, los trabajos de estos microorganismos, por separado, aunque a veces nos resulta difícil fijar sus límites y descripciones, pues parecen comunes.

Hemos realizado el estudio experimental en diversas etapas, primero para conocer individualmente los microorganismos basándonos en las técnicas citadas como habituales por otros autores; después, modificando diversos factores, estudiar sus alteraciones y comprobar sus posibles semejanzas o diferencias.

El plantear el trabajo con micoplasmas humanos y el encontrar (en el muestreo previo) el Streptococcus viridans como el microorganismo más frecuente en los muestras de la garganta, es lo que nos hace elegir éste como sujeto para la inducción de la forma L, ya que su presencia es positiva en enfermedades semejantes a las determinadas en localizaciones de micoplasmas.

Consideramos de interés la aportación de nuevos datos so-

bre la influencia de los componentes de los medios de cultivo en las variaciones morfogénicas de estos microorganismos. La variación de cualquier factor físico o químico da lugar a una serie de modificaciones que deben de conocerse en sus -- identificaciones aumentando así el amplio campo de las posibles investigaciones posteriores.

35 .

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIALES

1. Microorganismos.

Las estirpes bacterianas utilizadas en nuestro trabajo -- fueron seleccionadas por el Departamento Bacteriológico de la Ciudad Sanitaria "La Paz" y depositadas actualmente en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Madrid.

1.1. Micoplasmas.

Mycoplasma pneumoniae

Mycoplasma fermentans

Mycoplasma hominis

Mycoplasma orale tipo 1

Mycoplasma salivarium

Mycoplasma cepa I (ureoplasma urealiticum)

Mycoplasma laidlawii

1.2. Bacterias.

Streptococcus viridans 38487

Streptococcus viridans 38566

2. Animales de laboratorio.

Ratones blancos de 20-25 g. de peso.

"

3. Medios de cultivo.

3.1. Medios de micoplasmas.

3.1.1. Medios de transporte. Taylor - Robinson y -- col. (1969).

Caldo PPL0 (Difco)	70 c.c.
Solución de levadura al 25 %	10 c.c.
(Viena Madrid)	
Suero de caballo (Llorente)	20 c.c.

Conservar a 4°C. Descartar pasados 5 --
días.

Añadir en el momento de usar:

Kanamicina (Oxoid)	2 gammas/ c.c.
Keflin (Liade)	50 gammas/ c.c.
Anfotericina B (Fungizone)	5 gammas/ c.c.

pH final del medio: 7,8.

3.1.2. Medios de enriquecimiento.

3.1.2.1. Medio Hayflick (1965) con glucosa.

Caldo PPL0 (Difco)	70 c.c.
Penicilina G sódica	6.666U /c.c.
(Comp Esp Penicilina)	
Solución de acetato de talio al - - 2,5 %	2 c.c.
(BDH)	

Solución levadura al 25 %	10 c.c.
(Viena Madrid)	
Suero de caballo (Llorente)	20 c.c.
Solución rojo fenol al 1/100 (Merck) ..	2 c.c.
Solución de glucosa al 10 % (Analar)..	1 c.c.

pH final del medio: 7,8.

Conservar a 4°C. Descartar pasados 5 días.

3.1.2.2. Medio Hayflick (1965) con arginina.

Caldo PPL0 (Difco)	70 c.c.
Penicilina G sódica	6.666U /c.c.
(Comp Esp de Penicilina)	
Solución acetato de talio al 2,5 % ...	2 c.c.
(BDH)	
Solución levadura al 25 %	10 c.c.
(Viena Madrid)	
Suero de caballo (Llorente)	20 c.c.
Solución rojo fenol al 1/100 (Merck) ..	2 c.c.
Solución de arginina al 10 % (BDH) ...	1 c.c.
Acido clorhídrico N (para pH)	0,2 c.c.

pH final del medio: 7,0.

Conservar a 4°C. Descartar pasados 5 días.

3.1.2.3. Medio Hayflick (1965) con urea.

Caldo PPL0 (Difco)	70 c.c.
Solución acetato de talio al 2,5 % ...	2 c.c.
(BDH)	

Solución levadura al 25 %	10 c.c.
(Viena Madrid)	
Suero de caballo (Llorente)	20 c.c.
Solución de rojo fenol al 1/100 (Merck)	2 c.c.
Solución de urea al 10 % (BDH)	1 c.c.
Acido clorhídrico N (para pH)	0,5 c.c.
pH final del medio: 7,0.	
Conservar a 4°C. Descartar pasados 5 días.	

3.1.2.4 Medio Barile y col. (1966).

La base está constituida por:

Caldo PPLO (Difco)	2,1 g.
Extracto de levadura (Difco)	700 mg.
Fosfato bipotásico	500 mg.
Suero de caballo en agua bidestilada - estéril, en proporción 15 %	100 c.c.

Suplementada con:

a) Glucosa (Analar)	500 mg.
pH final del medio: 7,8.	
b) Arginina (BDH)	150 mg.
pH final del medio: 7,5.	
c) Urea (BDH)	200 mg.
pH final del medio: 7,0.	

3.1.3. Medios de aislamiento.

3.1.3.1. Medio de aislamiento en material contaminado. Medio Hutchinson líquido (1969).

Medio Hayflick en el que la penicilina y el acetato de ta
lio se sustituyen por 1 mg/c.c. de ampicilina; pH 6.

Hutchinson sólido.

A 1 litro de medio Hayflick se le añade 3,5 g. de Inoagar
(Oxoid) nº 2 y 1 mg/c.c. de ampicilino.

3.1.3.2. Medio con azul de metileno. Kraybill y_ Crawford (1965).

Medio Hayflick (1965) suplementado con 0,002 % de azul de
metileno.

3.1.3.3. Medio agar PPL0.

Agar PPL0 (Difco) 34 g.

Agua destilada 1.000 c.c.

pH final del medio: 7,8.

Suplementado con 25 % de líquido ascítico (Difco).

Preparación:

Preparado el agar y esterilizado a 120° durante 20 minutos,
cuando está a 50°C se rompe la ampolla del líquido ascítico_
(Difco) en ambiente estéril, se mezcla hasta estar homogénea_
mente distribuido.

Se tienden las placas. Descartar pasados 5 días.

3.1.3.4. Medio agar Micoplasmas.

Agar (Oxoid)	70 c.c.
Penicilina G sódica (C. Esp Penicilina)	6.666U /c.c.
Solución de acetato de talio al - -	
2,5 % (BDH)	2 c.c.
Solución de levadura al 25 % (V.M.)	10 c.c.
Suero de caballo (Llorente)	20 c.c.

pH final del medio: 7,8.

Preparación:

Cuando se ha realizado la preparación de Oxoid agar y se encuentra a unos 50°C se procede a calentar a 37°C a baño maría los restantes productos y mezclarlos.

Verter rápidamente unos 4 c.c. de la mezcla en cada placa, con pipeta estéril.

Conservar a 4°C. Descartar pasados 5 días.

Secar las placas en estufa, media hora antes de usar.

3.1.3.5. Medio Hepes agar. Medio Purcell y col.-
(1966).

Caldo PPLO (Difco)	21 g.
Agua desmineralizada	1.000 c.c.
Ácido clorhídrico N (para pH)	6,4 c.c.
Agar (Oxoid Nº 2)	14,28 g.
Hepes agar (Sigma)	17 g.

pH entre 6,0 y 6,5.

Preparación:

Disolver. Esterilizar en autoclave a 120°C. durante 20 minutos. Tender placas. Almacenar a 4°C. Descartar pasados 5 días.

Secar las placas en estufa a 37°C media hora antes de usar.

3.1.4. Medios de identificación.

3.1.4.1. Agar PPLO 2,3,5, trifenil tetrazolio.

Medio . 3.1.3.3. suplementado con 2,3,5, trifenil tetrazolio en proporción 0,005 % final.

2,3,5, trifenil tetrazolio (Sigma).

3.1.4.2. Agar PPLO hemolisis.

Medio . 3.1.3.3. suplementado con 5 % de sangre de caballo o humana.

3.1.4.3. Agar Columbia sangre.

Medio . 3.1.3.5. suplementado con sangre de caballo al 5 %.

Preparación:

A 95 c.c. de medio de cultivo agar Columbia a 50°C, se añaden en condiciones estériles 5 c.c. de sangre de caballo, mezclando homogéneamente.

Se tienden las placas con pipeta estéril. Descartar pasados 5 días.

"

Secar a 37°C en estufa durante 30 minutos antes de usar.

3.1.4.4. Agar PPLO chocolate.

Medio 3.1.3.3. suplementado con sangre de caballo o humana al 10 %.

Preparación:

A 90 c.c. de medio agar PPLO fundido en baño maría a 80°C se le agrega 10 c.c. de sangre manteniendo esta temperatura durante 10 minutos. Se agita y se vierte en placas. Conservar a 4°C. Secar en estufa durante 30 minutos antes de usar a 37°C. Descartar pasados 5 días.

3.1.5. Medio de conservación. Medio Loeffler.

Suero caballo (Oxoid)	750 c.c.
Caldo nutritivo (Oxoid)	2,5 g.
Peptona (Oxoid)	2,5 g.
Dextrasa (Difco)	2,5 g.
Cloruro sódico (Analar)	1,25 c.c.
Agua destilada c.s.p.	1.000 c.c.

Sembrar en tubo inclinado.

Preparación de los componentes de los diferentes medios de cultivo descritos.

A) Caldo PPLO (Difco):

Caldo W/o C.V. PPLO	21 g.
Agua destilada desmineralizada	1.000 c.c.

Preparación:

Disolver calentando ligeramente. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Envasarlo en frascos de 70 c.c.- Almacenar a 4°C.

B) Penicilina G sódica:

Penicilina G sódica 200.000 U (Comp Española Penicilina).

Ampolla agua Farmaes 3 c.c.

Importante: no añadir a los medios hasta el momento de su utilización.

C) Acetato de talio:

Acetato de talio (BDH) 2,5 g.

Agua destilada 100 c.c.

Preparación:

Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

D) Extracto de levadura:

Levadura prensada (Viena-Madrid) 250 g.

Agua desmineralizada 1.000 c.c.

Preparación:

Hervir durante 15 minutos moviendo continuamente la levadura troceada con el agua.

Centrifugar la mezcla a 2.000 rev/m. durante 30 minutos.-

Filtrar por papel de filtro dejando caer el líquido por las_

paredes para que no se rompa el papel. Repetir nuevamente el filtrado.

Medir el pH que se pretende sea 8, si no lo es, se ajusta con NaOH (8 c.c. aprox.). Esterilizar por filtración. Distribuir en 10 ó 15 c.c.

Almacenar a 4°C. Descartar pasado 1 mes.

Importante: remover con la espátula mientras hierve.

E) Solución rojo fenol:

Rojo fenol (Merck)	1 g.
NaOH N/ 10)Panreac)	28,2 c.c.
Agua desmineralizada c.s.p.	1.000 c.c.

Preparación:

Mezclar en mortero.- Añadir hasta 1 litro de agua desmineralizada. Distribuir en 50 c.c. Esterilizar en autoclave a - 120°C durante 20 minutos. Almacenar a 4°C.

F) Solución de Glucosa:

Glucosa (Analar)	10 g.
Agua desmineralizada	100 c.c.

Preparación:

Esterilizar por filtración.

Almacenar a 4°C.

G) Solución de arginina:

Arginina (BDH)	10 g.
Agua desmineralizada	100 c.c.

Preparación:

Esterilizar por filtración.

Almacenar a 4°C.

H) Solución de urea:

Urea (BDH)	10 g.
Agua desmineralizada	100 c.c.

Preparación:

Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

I) Solución de azul de metileno:

Azul de Metileno (Merck)	0,2 g.
Agua desmineralizada	1.000 c.c.

Preparación:

Calentar, disolver, filtrar por papel. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Almacenar a 4°C.

3.2. Medios de estreptococos.

3.2.1. Medios de enriquecimiento o crecimiento.

3.2.1.1. Agua de peptona.

Bacto peptona (Difco)	10 g.
Cloruro sódico (Analar)	5 g.
Agua destilada	1.000 c.c.

Preparación:

Disolver, calentando suavemente, la peptona en el agua destilada.

Ajustar con cloruro sódico N. pH hasta pH final: 7,6.

Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3.2.1.2. Medio Tood-Hewitt.

Caldo Tood-Hewitt (Oxoid)	36,4 g.
Agua destilada	1.000 c.c.

Preparación:

Disolver con calor suave. Ajustar pH 7,8 (aprox.) con cloruro sódico. Esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

3.2.1.3. Caldo nutritivo.

Caldo nutritivo (Oxoid)	3 g.
Bacto peptona (Difco)	10 g.
Cloruro sódico (Analar)	5 g.
Agua destilada	1.000 c.c.

Preparación:

Disolver. Ajustar pH 7,2 con cloruro sódico. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3.2.1.4. Caldo glucosado.

Caldo nutritivo suplementado con una solución estéril de glucosa en cantidad suficiente para que resulte una concentración final de glucosa de 5 %.

Ajustar a pH 7,6 con hidróxido sódico N/10 estéril.

3.2.2. Medios de aislamiento e identificación.

3.2.2.1. Agar nutritivo.

Caldo nutritivo (Difco)	1.000 c.c.
Agar noble especial (Difco)	15 g.

Preparación:

Disolver calentando suavemente. Ajustar pH 7,4 con cloruro sódico.

Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

3.2.2.2. Agar glucosado.

Agar nutritivo suplementado con una solución estéril de - glucosa en cantidad suficiente para que resulte una concentra ción final de glucosa del 2 %.

3.2.2.3. Agar sangre.

Agar nutritivo suplementado con el 5 % de sangre de caballo o humana, estéril.

Preparación:

Cuando se ha realizado la esterilización del agar nutritivo y se encuentra a unos 50°C se agrega 5 % de sangre de caballo o humana, estéril.

Se tienden las placas y se almacenan a 4°C. Secar en estufa media hora antes de usar a 37°C.

3.2.2.4. Agar chocolate.

Agar nutritivo suplementado con el 10 % de sangre de caba

llo o humana estéril.

3.2.2.5. Agar sangre con cristal violeta.

Agar sangre suplementado con solución de cristal violeta al 1/500.000. Cristal violeta (Panreac).

Preparación:

Cuando está preparado el agar nutritivo y se encuentra a 50°C. agregamos un 5 % de sangre de caballo o humana estéril y solución de cristal violeta al 1/500.000. Verter en placas.

Secar las placas en estufa, media hora antes de usar a - - 37°C.

3.2.2.6. Agar MacConkey.

Taurocolato sódico (Oxoid)	5 g.
Bacto-peptona (Difco)	20 g.
Cloruro sódico (Analar)	5 g.
Solución rojo neutro al 1 %	5 c.c.
Bacto agar (Difco)	15 g.
Agua destilado	1.000 c.c.

Preparación:

Disolver el taurocolato sódico, la bacto-peptona y el cloruro sódico en agua destilado, calentando ligeramente. Ajustar la reacción a pH 7,8 y agregar el bacto-agar.

Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Añadir la lactosa y el rojo neutro hasta conseguir un color moreno rojizo. Esterilizar en autoclave a 100°C durante

15 minutos.

Para verterlo en las placas esperar a que el medio se encuentre a 50-45°C, evitando así la formación de espuma en la superficie.

3.2.2.7. Agar esculina.

Agua de peptona	100 c.c.
Esculina (Difco)	0,1 g.
Citrato férrico (Panreac)	0,05 g.
Bacto agar (Difco)	1,0 g.

Preparación:

Se disuelve con ligero calentamiento el agar en agua de peptona. Se añade la esculina y el citrato férrico moviendo hasta disolución.

Se ajusta la reacción a pH 7,4. Distribuir en porciones de 3 c.c.

Esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos. Dejar solidificar en posición inclinada.

3.2.2.8. Medio Barnes.

Caldo nutritivo (Oxoid)	10 g.
Peptona Evans (Difco)	10 g.
Glucosa (Analar)	10 g.
Bacto agar	15 g.
Agua destilada	1.000 c.c.

Preparación:

Ajustar exactamente a pH 6. Esterilizar en autoclave a --
120°C durante 20 minutos.

En el momento de utilizarlo añadir asépticamente a 100 --
c.c. de la base, 1 c.c. de la solución A y 2 c.c. de la solu
ción B:

Solución A.

2,3,5, trifenil tetrazolio (Sigma) ...	1 g.
Agua destilada	100 c.c.
Esterilizada por filtración.	

Solución B.

Acetato de talio (BDH)	5 g.
Agua destilada	100 c.c.
Esterilizado por filtración.	

Estas dos soluciones se añaden a la base de agar fundida_
a baño maría hirviente y después de enfriada a 50°C. se tien
den las placas.

Secar en estufa, media hora antes de usar. Sembrar en es--
trías paralelas.

3.2.2.9. Medio de levanos.

Triptasa (Difco)	20 g.
Sacarosa (Merck)	50 g.
Glucosa (Analar)	1 g.
Fosfato bipotásico (Panreac)	4 g.
Bacto agar (Difco)	15 g.
Agua destilada	1.000 c.c.

Preparación:

Disolver. Ajustar pH a 7. Distribuir 5 c.c. por tubo. Ten
der placas.

Esterilizar en autoclave o vapor fluente durante 30 minu-
tos. Dejar enfriar en tubo inclinado. Sembrar en estrías pa-
rales.

Secar en estufa a 37°C, media hora antes de usar.

3.2.2.10. Agar sangre con 40 % bilis de buey.

Agar nutritivo al que se le añade 40 % de bilis de buey,-
filtrada sobre papel.

Repartir en tubos de 160 x 16 agregando 5 c.c. por tubo.-
Autoclavar 20 minutos a 120°C.

En el momento de empleo fundir a baño maría. Enfriar a --
50° y añadir 10 gotas de sangre de caballo por tubo.

3.2.2.11. Mitis salivarius agar base.

Mitis salivarius agar base (Oxoid) .. 87 g.

Agua destilada 1.000 c.c.

Preparación:

Ajustar pH 7 (aprox.). Esterilizar en autoclave a 120°C -
durante 15 minutos. Conservar a 4°C. Descartar pasados 5 - -
días. Secar en estufa a 37°C, media hora antes de usar.

3.2.2.12. Medio Packer.

Caldo nutritivo (Oxoid) 3,5 g.

Triptosa (Difco)	18 g.
Cloruro sódico (Analar)	6 g.
Bacto agar (Difco)	20 g.
Agua destilada	1.000 c.c.

Preparación:

Disolver calentando ligeramente con cuidado. Ajustar a pH 6,8 exactamente con ácido clorhídrico N.

Repartir a razón de 15 c.c. por tubo. Autoclavar a 120°C. durante 20 minutos.

Al utilizarlo, fundir a baño maría, enfriar a 50°C, añadir:

Sangre de caballo desfibrinada	1 c.c.
Azida de sodio (Difco)	1 c.c.
Solución de cristal violeta (Panreac)	1 c.c.

Verter en placas.

Preparación de solución de cristal violeta:

Cristal violeta (Panreac)	0,5 c.c.
Agua destilada	250 c.c.

Triturar en un mortero. Dejar disolver 24 horas a temperatura ambiente.

Diluir la solución al 1/10 con agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Preparación de azida de sodio:

Azida de sodio (Difco)	0,25 g.
Agua destilada	25 c.c.

Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3.3. Medios de cultivo utilizados para formas L.

3.3.1. Inducción.

3.3.1.1. Medio líquido base.

Caldo nutritivo (Oxoid)	1 g.
Bacto peptona (Difco)	10 g.
Cloruro sódico (Analar)	5 g.
Solución rojo fenol al 1,1 % (Merck).	2 c.c.
Agua destilada	1.000 c.c.

Preparación:

Disolver, ajustar a pH 7,6. En el momento de su utilización se adiciona la penicilina sódica en dos gradientes de 6.666 y 13.222UI/c.c. al medio respectivamente.

3.3.1.2. Medio bifásico.

Medio líquido base agregado a tubo de agar nutritivo inclinado formando pues de fases líquido-sólido.

3.3.1.3. Medio agar 0,8 %.

Caldo nutritivo (Oxoid)	3 g.
Bacto peptona (Difco)	5 g.
Cloruro sódico (Analar)	5 g.
Bacto-agar (Difco)	8 g.
Agua destilada	1.000 c.c.

Preparación:

Disolver con calentamiento suave. Ajustar pH 7,2. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Conservar a 4°C.

3.3.1.4. Medio salino para forma L. Medio.Lavillaureix.

Bacto agar (Difco)	15,0 g.
Manitol (Merck)	2,5 g.
Fosfato bipotásico (Panreac)	0,5 g.
Sulfato magnésico (Panreac)	0,2 g.
Cloruro sódico (Analar)	0,1 g.
Carbonato cálcico (Panreac)	3,0 g.
Extracto de levadura (Difco)	1 g.
Agua destilada	900 c.c.
Glicina 5 %.	

Preparación:

Se disuelve el manitol y el extracto de levadura en unos 200 c.c. de agua. Ajustar pH 6,8.

Se esteriliza a vapor fluente durante media hora.

Las sales, el agar y el resto del agua se esterilizan a 120°C durante 20 minutos. Se mezclan ambos y se les da una corriente de vapor. Se vierten en las placas.

Secar en estufa a 37°C 15 minutos antes de usar.

3.3.2. Medio reversión.

3.3.2.1. Medio de agar gelatina.

Extracto caldo buey (Difco)	3 g.
Bacto peptona (Difco)	5 g.
Bacto gelatina (Difco)	8 g.
Bacto agar (Difco)	10 g.
Agua destilada	1.000 c.c.

Preparación:

Rehidrotar. Calentar suavemente para disolver. Envasar en tubos de 10 c.c.

Esterilizar en autoclave a vapor fluente durante 30 minutos, para evitar la despolimerización de la gelatina.

pH final 6,8.

4. Colorantes.

4.1. Solución Gram standard.

a) Solución de cristal violeta oxalatada:

Cristal violeta (Panreac)	2 g.
Alcohol etílico de 95% (Panreac)	20 c.c.
Oxalato amónico (Merck)	0,8 g.
Agua destilado	80 c.c.

Preparación:

Triturar en mortero el cristal violeta y disolver en el alcohol. Mezclar el oxalato amónico con el agua destilada. Filtrar.

"

Mezclar ambas disoluciones.

b) Solución yodada de lugol:

Yodo (Panreac)	1 g.
Yoduro potásico (Panreac)	10 g.
Agua destilada	100 c.c.

Preparación:

Disolver los elementos sólidos en unos 10 c.c. de agua -- destilada. Agregar el resto del agua. Conservar en ausencia_ de luz, en frasco de vidrio color.

Desecharlo cuando al cabo de los días el color comienza a aclararse.

c) Solución de safranina:

Safranina (Riedel-De-Häen)	0,25 g.
Alcohol etílico de 95°	10 c.c.
Agua destilada	100 c.c.

Preparación:

Mezclar y disolver.

El alcohol empleado para el Gram standard es de 90°.

4.2. Solución Giemsa.

Azur-eosina-azul de metileno para <u>mi</u> croscopía (Merck)	0,76 g.
Glicerina bidestilada pura (Merck)..	50 c.c.
Metanol para análisis (Panreac)	50 c.c.

Preparación:

Se incorpora el colorante a la glicerina y se calienta durante 3 horas en baño maría a 60°C. Seguidamente se añade metanol. La solución se deja en reposo durante 5 días y a continuación se filtra.

4.3. Solución May-Grünwald.

Eosina-azul de metileno para microscopía (Merck)	0,25 g.
Metanol para análisis (Panreac)	100 c.c.

Preparación:

Se disuelve el colorante calentando ligeramente a 60°C en baño maría. Una vez frío se filtra.

4.4. Solución Dienes (1939).

Azul de metileno (Merck)	2,5 g.
Azur II (Merck)	1,25 g.
Maltosa	10 g.
Carbonato de sodio	0,25 g.
Agua destilada	100 c.c.

Preparación:

Mezclar los productos hasta homogeneidad. Filtrar sobre papel.

Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

"

4.5. Solución de tionina.

Tionina (Merck)	1 g.
Solución acuosa de fenol al 2,5 % ..	100 c.c.

Preparación:

Para su empleo diluir una parte en cuatro de agua destilada y filtrar.

4.6. Azul de metileno alcalino de Loeffler.

Azul de metileno (Merck)	0,3 g.
Alcohol etílico de 95° (Panreac) ...	30 c.c.
Hidróxido potásico (Panreac)	0,01 g.
Agua destilada	100 c.c.

Preparación:

Disolver completamente el azul de metileno en el alcohol etílico, se trata de una solución saturada.

Disolver el hidróxido potásico en el agua destilada.

Mezclar las soluciones agitando continuamente. Filtrar antes de su empleo.

5. Aparatos.

- Lupa estereoscópica modelo Wild M 5.
- Espectrocolorímetro modelo Bausch and Lomb 20
- Fotomicroscopio Zeis.

Fotos colonias - objetivo Neofluor 6,3/0,20 160/-

ocular K β l 10x
filtro semigris.

Fotos tinciones - objetivo inmersión

ocular K β l 10x
sin filtro.

Carrete - Kodak.

- jarras anaerobiosis.

Sobres Gaspak BBL -

- Equipo de filtración.

A) Pirex (TM) aparato de filtración al vacío Millipore
re - 30 c.c.

- Pirex (TM) jeringas.

- Filtros - Millipore celulose - ester.

(Millipore Bedford, Mas) 0,45 μ m y - -
0,22 μ m blanco, pre-esterilizado.

B) Aparato EKA de acero inoxidable, 500 c.c.

- Filtros -EKA- de membrana con retículo enrejado -
tipo - nitrocelulosa - SM 11406050 ϕ 50 mm.

6. MÉTODOS.

6.1. Métodos para micoplasmas.

6.1.1. Método de transporte o recogida de muestras.

Con una torunda estéril, obtener el material por raspado faríngeo o exudativo. Inocular en el caldo de transporte, colocando la torunda impregnada dentro del tubo, presionándola contra la superficie interna del tubo hasta que se rompa el polillo y caiga la porción del algodón dentro del medio. Cerrar con tapón de rosca.

6.1.2. Método de aislamiento de micoplasmas de muestras.

Contamos con dos métodos:

A) Tomamos una pequeña porción de la muestra (frotis vaginal, esputo, centrifugado de orina, saliva, etc.) y la sembramos en el medio Hutchinson líquido. Incubamos a 37°C en atmósfera CO₂ durante 24-72 horas.

Sembramos estos cultivos en medio Hutchinson sólido para proceder al aislamiento y determinación de las pruebas de identificación.

B) Para el aislamiento de micoplasmas en muestras patológicas, contamos con las propiedades de estar estos microorganismos limitados por una membrana débil y delgado de gran --

plasticidad y el presentar un tamaño comprendido entre 125--250 μ m de diámetro, lo que nos permite separarles en una - - muestra múltiple realizando una filtración a través de filtros Millipore de 0,45 μ m de poro, mientras que las bacterias acompañantes quedan retenidas.

Asimismo los medios de transporte llevan en sus componentes sustancias como penicilino, cefalotina, etc. que ya permiten directamente el aislamiento de numerosas bacterias.

6.1.3. Métodos de enriquecimiento.

Las siembras de las muestras ya filtradas o de los micoplasmas, en sí, son realizadas en primer lugar en los medios líquidos específicos de Hayflick (1965) o Barile y col. (1966) ya descritos en el apartado de Materiales. Estos medios enriquecidos permiten aumentar el número de microorganismos y -- así poder realizar sus identificaciones.

Las siembras se efectúan en frasquitos de vidrio de 2 c.c. Formamos series de 10 tubos, colocando siempre un testigo.

Se efectúan diluciones de 0,5 c.c. de suspensión bacteriana en 1,5 c.c. de medio líquido específico. Desde el tubo 1 al 9.

La temperatura de incubación más idónea es los 37°C, el tiempo de incubación varía para cada micoplasma, depende también del medio utilizado para su crecimiento.

Las siembras en medios sólidos se hacen inundando la superficie de la placa con los 0,5 c.c. de los medios líquidos

de cultivo, quitando el sobrenadante al cabo de 15 minutos.-

La incubación se hace a 37°C en atmósfera CO₂ creada por el sistema Gaspak utilizando los jarros de anaerobiosis.

La observación se hace en microscopio ordinario o con lupa estereoscópica.

Para el aislamiento de una determinada colonia podemos -- utilizar el sistema Crawford y Kraybill (1967), llamado el - "cuadradito", consiste en mediante una espátula, cortar un - cuadradito del agar en el que está colocada la colonia de es tudio y colocarle en una nueva superficie de cultivo, colo-- canda la colonia en contacto con esta superficie, bien adhe- rida. Dejarlo así varios días, al cabo de los cuales ayudádo nos de la espátula arrastramos este trocito sobre la superfi cie de cultivo llevando nuevamente estas placas a incubación.

Observaremos el crecimiento de colonias nuevas a la largo del recorrido del cuadradito sobre la superficie de la placa. De esta manera podemos obtener varias colonias a partir de - una aislada interesante.

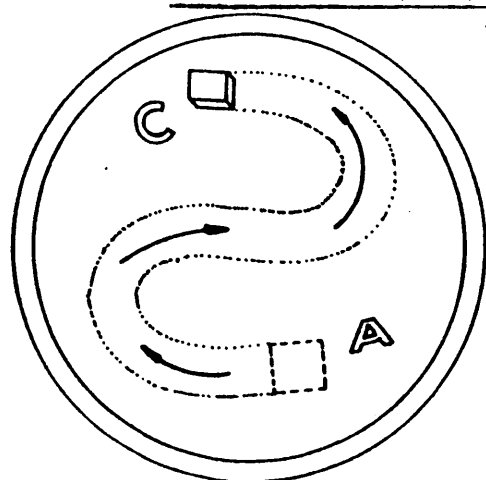
Este procedimiento se usa también para a partir de una co lonia pasarla a medio líquido y aumentar así su número. Esto lo realizamos colocando ese trocito de agar con una espátula en el interior del medio líquido específico. Dibujo.

6.1.4. Método recuento total y viables.

Utilizamos el método de Smith (1971).

Sistema Crawford y Sangre 11-12

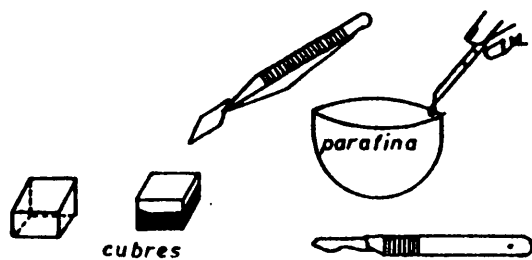
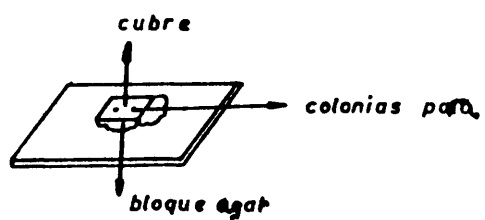
-47-



A - posición inicial

C - posición final

Tinción de colonias para técnicas de fotografía



-(11)-

Tomamos un volumen determinado de cultivo líquido en el - que hemos comprobado el crecimiento, y lo sembramos sobre la superficie de placa de medio agar PPL0, extendiéndolo uniformemente. Si es necesario puede diluirse el inóculo en el medio específico para evitar un crecimiento excesivo. Anotando la dilución efectuada.

Se incuban las placas a 37°C en medio CO₂ creado por el sistema Gaspak.

Una vez observado el crecimiento, cortamos bloques del -- agar y les colocamos en portaobjetos que cubrimos con cubreobjetos, sellando las preparaciones con uno mezcla de vaseli na y parafina. Utilizamos porta y cubreobjetos milimetrado.- Observamos estas preparaciones al microscopio de contraste - de fases utilizando objetivo de inmersión.

El número de micoplasmas en 5 ó 10 campos del microscopio, así como los agregados (cada agregación se toma como 1 organismo), son anotados.

El recuento total (T) del cultivo original fue obtenido de la fórmula:

$$T = \frac{n_1 a_1 d}{a_2 v}$$

n_1 = es el número de micoplasmas por campo de microscopio.

a_1 = el área de la superficie de la placa de agar.

a_2 = el área del campo de microscopio.

d = el grado de dilución de la muestra distribuida sobre la placa de agar.

El recuento de viables (v) del cultivo líquido se obtiene reemplazando n_1 en la fórmula con la media de microcolonias_ por campo de microscopio observado, de los cultivos en por--tas.

6.1.5. Métodos identificación de micoplasmas.

6.1.5.1. Fermentación de la glucosa.

Se cultivan los micoplasmas en el medio Hayflick (1965) - adicionado de glucosa, durante varios días, a 37°C en anaerobiosis, observándose para Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma fermentans y Mycoplasma laidlawii la característica de utilizar la glucosa con poder fermentativo y acidificación secundaria, por ello se les considera glucidolíticos. Observándose el crecimiento de colonias típicas de "huevo frito" mediante la siembra en placas de estos cultivos líquidos.

Esta propiedad fue estudiada por Smith y col. (1967) para Mycoplasma pneumoniae por primera vez.

6.1.5.2. Desaminación de la arginina.

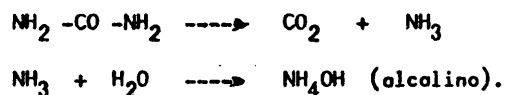
Los micoplasmas son cultivados en el medio Hayflick (1965) adicionado de arginina durante varios días a 37°C en anaerobiosis, observándose para los Mycoplasmas Hominis tipo 1, -- Mycoplasma orale y Mycoplasma salivarium el crecimiento, -- transformando la arginina en ornitina.

La arginina es sometida a desaminación hidrolítica y des-

carboxilación, dando ornitina + CO_2 + 2NH_3 .

6.1.5.3. Utilización de la urea.

Se cultivan los micoplasmas en el medio Hayflick (1965) - adicionado de urea durante varios días a 37°C en anaerobiosis, observándose que Mycoplasmas cepa I requieren urea, poseen una ureasa que condiciona su actividad óptima a un pH 6, de tal manera que varía el pH a 8,0 ó 9,0 que observamos por un cambio de color de amarillo a púrpura.



6.1.5.4. Resistencia al acetato de tolúo.

El acetato de tolúo es uno de los componentes agregados a los medios líquidos para cultivos de micoplasmas por su acción bacteriostática sobre microorganismos aerobios esporulados y bacterias Gram negativas.

En el caso de cultivos de Mycoplasmas cepa I, el acetato de tolúo resulta tóxico, observándose la falta de crecimiento cuando se realiza la siembra de las cepas I en media, que contenga acetato de tolúo.

La propiedad de inhibir a la cepa I fue descrita por -- Shepard y Lunsford (1967).

6.1.5.5. Reducción aeróbica del cloruro de 2,3,5, trifenil tetrazolio.

Somerson y Morton (1953) y Pegram (1969) encontraron que 6 cepas de micoplasmas reducían el TTC cuando se incubaban - anaeróticamente; la reacción era visible a los 4 ó 5 días y completo a los 6 - 10 días.

El cultivo se realiza sobre medio Hayflick (1965) en las que el reactivo está en concentración 0,002 %, no excediendo el 0,005 %, pues concentraciones mayores resultan inhibitorias.

La siembra se realiza por las técnicas habituales de micoplasmas. Incubación a 37°C en aerobiosis y anaerobiosis, observándose la aparición de un halo rosa para los cultivos -- del Mycoplasma pneumoniae en medio aeróbico.

Esta propiedad de ser el Mycoplasma pneumoniae capaz de - reducir el TTC aeróticamente y el resto de los micoplasmas - humanos, anaeróticamente fue establecida por Kraybill y Crawford en 1965.

6.1.5.6. Viraje del medio con azul de metileno.

La utilización del medio Kraybill y Crawford (1965), en el que el azul de metileno va en proporción 0,002 % para los micoplasmas, nos permite identificar el crecimiento en el medio líquido por viraje del indicador del azul al verde por acidificación del medio por el Mycoplasma pneumoniae y en el

medio sólido por crecimiento sobre la superficie del agar -- con azul de metileno de las colonias características de "huevo frito"

6.1.6. Métodos de Análisis Antigénico.

Introducción.

La primera reacción aplicada para la diferenciación serológica de las cepas fue la aglutinación utilizada por Edward (1950) para los micoplasmas de origen animal, pero al exigir esta reacción una gran cantidad de anticuerpos difíciles de obtener y como el antígeno no formaba una suspensión estable, se pasó a utilizar la técnica de fijación de complemento.

Así se descubrió que los cepos tenían, todos, un antígeno común y surgieron los prototipos (como Mycoplasma hominis 1 y 2, etc.).

Card (1967) obtuvo reacciones cruzadas en la fijación del complemento.

La heterogenidad antigénica de los Mycoplasmas hominis ha sido confirmada por Pease (1965) y Taylor-Robinson y col. -- (1963).

La constitución química de los antígenos difiere según -- las especies:

galactosa para los Mycoplasmas micoides,
lípidos de la membrana para M pneumoniae y fermentans,
proteínas de superficie para M pulmonis.

Edward y Fitzgerald (1954) afirman que el suero que contiene los anticuerpos específicos puede impedir, sin la intervención del complemento el crecimiento del género homólogo. Esto constituye la base importante del test: inhibición del metabolismo glucolítico por el Mycoplasma pneumoniae, inhibición de la descomposición de la arginina por el Mycoplasma hominis o de la urea por el Mycoplasma cepa T.

En el caso de los micoplasmas animales los análisis ontigénicos nos sirven para la identificación de numerosas enfermedades infecciosas, Fabricant (1958) demostró que la enfermedad por Mycoplasma sinoviae está muy difundida en las monadas de gallinas y da reacciones cruzadas con el antígeno de Mycoplasma gallisepticum. Este antígeno está formado por una suspensión inactivada de la cepa S₆ de Mycoplasma gallisepticum.

Ahora bien, pueden existir aves que ya hayan estado en contacto con micoplasmas y tal vez la reacción indique en el momento de aparecer como positiva, que la enfermedad no es ERC pues pueden estar formados en época anterior. Pero, por el contrario, la reacción negativa puede darse en los comienzos de la infección por micoplasmas, por lo ya descrito.

Por ello se vio que este antígeno solo tiene valor para indicar si un grupo de aves estuvo o no con anterioridad en contacto con micoplasmas y para deducir si una manada está libre de micoplasmas y así prevenir las reproducciones no --

contaminadas.

Técnicas del análisis serológico.

6.1.6.1. Fijación del complemento.

Preparación de antígeno.

Preparar frascos conteniendo 100 c.c. de medio Hayflick - (1965) (glucosa, arginina, urea).

Sembrar con crecimiento reciente en medio líquido, en 5 - de ellos.

Incubar a 37°C durante 4 o 6 días.

Recoger el crecimiento centrifugando el caldo a 18.000 r. p.m. durante 1 hora.

Decantar todo el líquido quedando en el tubo 2 c.c. de -- fondo. Resuspender esta porción en solución amortiguadora sa lina de veronal al 1/50 de su volumen original. Al añadir la solución amortiguadora, si el volumen original de caldo del _ que partimos era 1 litro, se debe resuspender solo en 20 c.c. de solución amortiguadora (1/50 del volumen primitivo). Añadir fenol líquido (0,5 c.c. por 100 c.c. de amortiguador) co mo conservador.

Antes de probar el antígeno dejarlo reposar durante 2 a 3 semanas a 37°C o colocar el tubo en agua hirviendo durante - 30 minutos. Esto suele eliminar la actividad anticomplementaria del antígeno; después se titula para actividad anticom-- plementaria y hemolítica. Se usa el método Klomer-Eagle. La _

microtécnica aplicada al método Klomer se ha empleado con -- muy buenos resultados.

Se usan en cada prueba dos unidades del antígeno anterior con dos unidades de complemento y dos de hemolisina.

Los anticuerpos que desvían el complemento aparecen desde el 7º día después del comienzo de la infección. Su título aumenta rápidamente. Pueden persistir varios meses.

6.1.6.2. Aglutinación.

A) Aglutinación lenta del suero.

Técnica:

Mezclados suero y antígeno, los tubitos se colocan 2 ho-- ras a baño maría a 37°C y luego se guardan en nevera toda la noche, al día siguiente se dejan a temperatura ambiente has-- ta que pierdan el frío y se realiza la lectura.

La aglutinación aparece típicamente en los casos (+). El_ aglutinado se deposita como pielecitas sobre el fondo del tubo, mientras que el líquido restante queda claro más o menos opalino.

La máxima dilución del suero con aglutinación al 50 % se_ designa como título final.

Cuando hay resultado (-) la suspensión no se altera, ya - que los micoplasmas sedimentan más lentos y falta la bola de sedimentación.

"

B) Aglutinación rápida del suero.

Técnica:

Sobre portaobjetos se mezcla 1 gota de antígeno de micoplasmas con 1 gota del suero o de dilución de éste. Se mueve el portaobjetos con cuidado 2 minutos y se lee el resultado.

Para determinar el título final del suero se trabaja con diluciones de éste en progresión geométrica con factor de dilución $1/2$.

Para la lectura de la reacción se dan tiempos diferentes. Nagrii recomienda leer al cabo de 1 minuto. Halder al cabo de 4 minutos.

Con resultados (+) aparece aglutinación de flóculos gruesos, con resultado (-) el líquido permanece turbio.

La aglutinación lenta es más sensible que la rápida y permite una valoración cuantitativa por valoración de los sueros.

6.1.6.3. Hemaglutinación.

Técnica:

Con los cultivos de micoplasmas se hacen series de diluciones de $1/2$ hasta $1/64$ y se mezclan con suspensión de glóbulos rojos de cordero al 2%, el resultado se lee a los 30 minutos de permanecer en temperatura ambiente.

De gran importancia para la capacidad aglutinante es que el cultivo sea joven, pues decrece con la acidificación del

caldo y su formación es máxima en pH 5,5 (generalmente en es
te momento el medio está turbio y amarillo dorado).

El título del suero es dado por la más alta dilución, per
mitiendo observar la aglutinación de los glóbulos sensibili-
zados.

Los hematíes se transforman en aglutinables en presencia_
de anticuerpos específicos. Los sueros a titular están des--
complementados, después diluidos en suero de conejo inactivo
do, absorbido con los glóbulos de cordero.

T A B L A . A

RELACIONES ANTIGENICAS DE LAS ESPECIES DE MYCOPLASMAS HUMANOS DEMOSTRADAS POR PRUEBAS
DE HEMAGLUTININACION INDIRECTA.

<u>Antisuero de conejo</u>	<u>M hominis</u> <u>tipo I</u>	<u>M hominis</u> <u>tipo II</u>	<u>M salivarium</u>	<u>M orale</u>	<u>M fermentans</u>	<u>M pneumoniae</u>
M hominis tipo I ...	1.280	20	160	160	<20	<20
M hominis tipo II ..	40	2.560	160	<20	<20	<20
M salivarium	<20	40	2.560	40	<20	<20
M orale	160	160	1.280	2.560	<20	<20
M fermentans	<20	<20	<20	<20	80	<20
M pneumoniae	<20	<20	80	<20	<20	640

- 25 -

Resultados expresados como recíprocos del título sérico
Hayflick, D.L. y Chanock, R.M. Bact. Rev. 29:185 (1965).

Reacción de inhibición de la hemaglutinación.

Se trata de inhibir la actividad hemaglutinante de micoplasmas por anticuerpos homólogos.

El antígeno hemaglutinante se clasifica según un sistema caprichoso, así:

Dilución	1/2	2 unidades.
	1/4	4 unidades.
	1/8	8 unidades.
	1/16	16 unidades, etc.

Se preparan diluciones de suero 1/2 hasta 1/64 con solución fisiológica. Se añade el antígeno y después de 20 minutos a temperatura ambiente se añade la suspensión de eritrocitos al 2 %.

Al cabo de 30-40 minutos a temperatura ambiente se leen los resultados.

Lectura:

Positiva: inhibición de 8 unidades de antígeno con una dilución del suero al 1/32 y valores superiores.

Sospechosa: inhibición de 8 unidades de antígeno en dilución de suero 1/8 hasta 1/16.

Negativa: hay hemaglutinación en todas las diluciones del suero o inhibición solo en concentración 1/2 o 1/4.

"

Este método es muy conveniente para la determinación del grado de contaminación de un grupo de animales, para lo que

basta demostrarla en el 10 % de los animales, y para comprobar las reacciones poco claras o sospechosas de aglutinación.

6.1.6.4. Aglutininas al frío. Crioaglutinación.

En este caso el anticuerpo es una macroglobulina que aglutina glóbulos rojos de adulto a una temperatura de 4 grados_ y que está presente a títulos bajos en muchas personas normales.

Se desarrolla durante la segunda o tercera semana de la enfermedad y disminuye después lentamente.

Los títulos altos pueden estar asociados con la aparición de una anemia hemolítica.

Los anticuerpos del Streptococcus MG se presentan generalmente en el 40 % de los casos pero la asociación resulta a veces inespecífico.

Estas aglutininas frías son pues elaborados en el curso de la infección.

Estas aglutininas frías aparecen hacia el 7º día, son máximas al 15º día, decrecen y desaparecen después de la convalecencia.

La reacción no es válida más que a un título superior o - 1/64.

Estas crioaglutininas son macroglobulinas o anticuerpos - IgM de especificidad I, distintos de los anticuerpos específicos descubiertos por inmunofluorescencia, fijación de complemento o inhibición del crecimiento.

Según la técnica de Krech y Modde (1966), la sangre se -- calentó dos horas a 37°C. Se centrifugó y el suero se tituló a 4°C contra eritrocitos del grupo O.

Existe una prueba de orientación rápida que es:

Prueba rápida de las crioaglutininas.

Técnica de Garrow (1958).

Se ponen 0,2 c.c. de sangre obtenida por punción de un de do o del lóbulo de la oreja, en un pequeño tubo de ensayo que contenga 0,2 c.c. de citrato sódico al 3,8 %. Se tapa el tu- bo y se le pasa repetidas veces por la superficie de unos cu bos de hielo, se le deja tumbado en la superficie del hielo_ durante 15 segundos. Se retira el tubo tomándole con unas -- pinzas y se deja deslizar la sangre sobre la superficie de - vidrio del tubo aún frío.

Se considera positiva la presencia de una aglutinación flo cular grosera y como negativa la falta de aglutinación o la_ presencia de una aglutinación fina.

La crioaglutinación no es una reacción muy utilizada para el diagnóstico, pues no es muy específica, ya que a veces en fermos infectados por Mycoplasma pneumoniae no elaboran aglu- tininas frías y afecciones diversas, como cirrosis mononucleo- sis infecciosa, se acompañan de una elaboración de crioaglu- tininas.

6.1.6.5. Producción de hemolisinas.

Una de las propiedades de los micoplasmas es la de producir hemolisinas.

Somerson y Clyde han demostrado la aparición de alfa hemolisis en glóbulos rojos de cobayas y ovejas, y beta hemolisis en glóbulos rojos de caballos.

Ambos autores coinciden en que el Mycoplasma pneumoniae es la única especie de micoplasmas humanos que produce beta hemolisis en sangre de caballo, mientras que las demás especies lo presentan alfa.

Según las técnicas de Block, la hemolisis en general depende de una serie de variantes:

- a) densidad de la colonia.
- b) composición del medio.
- c) atmósfera de incubación.
- d) delgadez de la cubierta de sangre en el agar.
- e) pH del medio.

Técnica.

Verter una delgada capa de agar sangre (unos 3 c.c.), preparada al 5 % de sangre de caballo o humana y al 3 % si es sangre de cobaya, en medio agar PPLO sobre cuya superficie se presenten ya las colonias bien crecidas.

Incubar estas placas a 37°C en anaerobiosis (sistema Gas-pak), en jarras de anaerobiosis, y al cabo de 24 ó 48 horas

ya se empieza a apreciar la hemolisis.

Puede decirse que es entre el día 6 al 8 de cultivo, cuando la hemolisis está más neta.

6.1.6.6. Propiedades hemoabsorbentes.

Las colonias de Mycoplasma pneumoniae absorben los hemátíes de gallina, conejo, rata y mono.

Esta hemoabsorción es continuada en una segunda fase de la lisis de los glóbulos rojos.

6.1.6.7. Inmunofluorescencia indirecta.

La fluorescencia como medio de identificación de los anticuerpos es un método para "marcarles" y poder observarles al microscopio fluorescente, comprobando las reacciones antígeno-anticuerpo.

Fue el primer método utilizado por Liu Chien, en 1957, para el diagnóstico serológico de las pleuroneumonías atípicas primitivas debidas al agente Eaton.

Técnica.

El fundamento de esta técnica es el siguiente:

Frotis o cortes conteniendo antígenos se tratan con anticuerpos adecuados "marcados" por un tinte fluorescente.

Cuando se realiza la reacción antígeno-anticuerpo el anticuerpo y el colorante se mantienen y se hacen visibles cuando se estudian en el microscopio fluorescente.

El antígeno para estos microorganismos está formado por -

cortes de embriones de gallina infectados. Huevos de trece - días son inoculados por vía amniótico y después incubados 7_ días a 37°C.

Los pulmones y la parte inferior de la tráquea son aislados y congelados a 0°C y cortados, con un microtomo de congelación, en capas de 4 a 5 micros que son depositados sobre una lámina portaobjetos, descongelados bruscamente y fijados con acetona, se conservan a -20°C.

Cada pulmón provee de 100 a 200 capas.

Otra manera de obtener el antígeno es a partir de colonias jóvenes obtenidas sobre la superficie de agar enriquecido.

Los diluciones de los sueros a titular deben ser realizadas en suero fresco de cobaya diluida al 1/10 con un tampón de veronal a pH 7, ya que según Liv, los sueros frescos de hombre y cobaya contienen un factor vecino del complemento que favorece la reacción antígeno-anticuerpo.

Un frotis conteniendo los microorganismos se cubre con suero antibacteriano de conejo.

Después, a las 10 a 30 minutos, el suero que no reaccionó, se elimina por lavado, y el frotis se trata con globulina anticonejo, fluorescente.

Las células bacterianas que reaccionaron con el antisuero, serán envueltas con los anticuerpos de conejo (globulina) y por ello reaccionarán con la globulina marcada anticonejo, -

lo que se identifica por fluorescencia.

Esta técnica es de gran sensibilidad.

Detecta anticuerpos que aparecen a la 2ª y 3ª semana de la enfermedad que persisten un año o más y evolucionan paralelamente o los anticuerpos neutralizando la infección del agente Eaton (Mycoplasma pneumoniae) en la rata algononera.

6.1.6.8. Inhibición del crecimiento.

A) Dilución en tubitos.

B) Discos.

A) Dilución en tubitos.

Dilución de antisero y suspensión de micoplasmas, agrediendo cultivos de la misma especie y cantidad.

Incubando 24 a 72 horas y comparando con el control.

B) Discos.

La inhibición del crecimiento de micoplasmas alrededor de un disco impregnado de antisero específico con título elevado es un método para identificación, pero no permite un estudio detallado cuantitativo.

Mediante la preparación de discos múltiples con antiseros, mojando la punta de cada banda radial del disco en un antisero diferente, podemos determinar de qué micoplasma se trata.

Colocamos la banda con discos de la misma cantidad de antisero en el agar de cultivo de los micoplasmas y a los 3 ó

4 días se mide la inhibición.

6.1.7. Inhibición del crecimiento.

6.1.7.1. Inhibición del crecimiento. Inhibición de reducción del cloruro de 2,3,5, trifenil tetrazolio.

Una solución acuosa de cloruro de 2,3,5, trifenil-tetrazolio conservada fuera de la luz es agitada y adicionada a un cultivo de micoplasmas líquido en una concentración final de 0,05 %.

Una unidad TCR, es decir, la mayor dilución de cultivo - da lugar a un cambio de color después de un período de incubación de 10 a 12 días a 37°C en oscuridad, para evitar la fotoreducción del tetrazolio.

El suero a titular descomplementado está diluido en serie de dos en dos en un medio standard.

A cada tubo se le añade una dilución de cultivo en ebullición, conteniendo una unidad TCR.

La lectura se suele realizar el 6º día, cuando las titulaciones paralelas del inóculo indican que una unidad TCR está presente en el test.

6.1.7.2. Inhibición del crecimiento. Inhibición de la fermentación de la glucosa.

Utilizamos la técnica de Le Pois (1970).

La adición de suero que contiene los anticuerpos específicos

cas a un cultivo de Mycoplasma pneumoniae, inhibiendo la multiplicación del microorganismo, inhibe la acidificación de un medio de crecimiento que contiene 1 % de glucosa y rojo fenol.

Un test colorimétrico se usa para la titulación de los anticuerpos séricos, su presencia se traduce por el no viroje del indicador.

Para su realización los sueros descomplementados son diluidos de dos en dos en un medio de cultivo enriquecido de glucoso y rojo fenol.

A cada dilución sérica se añade aproximadamente 100 unidades.

Los tubos son cerrados herméticamente a 37°C, durante 5 días.

El título del suero es dado por la mayor dilución que impide una bajada de pH de media unidad, apreciada por comparación con el pH de los tubos testigo, inoculados con el mismo número de microorganismos en ausencia de antisuero.

Los anticuerpos que inhiben el metabolismo son de aparición lenta, hacia la 2ª y 3ª semana de la enfermedad, y crecen hasta el 6º mes, después de la infección.

6.1.8. Test del DNA homólogo.

La técnica de identificación por el test DNA- homólogo dada por Roquel y col. (1965) y Reich y col. (1966), no se proce

tica en los exámenes rutinarios por las técnicas tan especializadas que requieren. Es una técnica muy segura.

En la mayoría de los casos sus resultados son coincidentes con los del diagnóstico serológico.

6.2. Métodos para estreptococos.

6.2.1. Método para conservación y transporte.

Para la conservación y transporte utilizamos el medio - - Loeffler, guardándolos en nevero a -20°C. Cada 6 meses se hicieron resiembras en placas de agar sangre, comprobando sus - - pruebas de esterilidad e identificación.

6.2.2. Métodos de identificación.

Los Streptococcus viridans fueron sometidos a las siguientes pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas para su identificación.

6.2.2.1. Pruebas morfológicas.

1) Observación en vivo, realizada a las 34 horas de cultivo en medio Todd-Hewitt en la que se anotó la forma y tamaño.

2) Tinción de Gram realizada a las 48 horas de su siembra en medio Todd-Hewitt y en agua de peptona, en las que se observó la forma y su posible variación con la edad, coloración

Gram y el tamaño.

En los cultivos en placas observamos los distintos aspectos morfológicos.

6.2.2.2. Pruebas fisiológicas.

A) En caldo común y medio Todd-Hewitt observamos el crecimiento, turbidez, formación de película, sedimento.

B) Relacionamos la morfología con la fisiología o transformaciones ocurridas al variar los componentes del medio.

6.2.2.3. Pruebas bioquímicas.

Alfo hemolisis en agar sangre y agar chocolate.

Crecimiento en medio agar sangre con cristal violeta.

No crecimiento en agar MacConkey.

No hidrolisis de agar esculina.

No resistencia al calor.

Solubilidad en bilis.

Actividad catalásica.

Actividad oxidásica.

Sensibilidad a la bacitracina.

No sensibilidad a la optoquina (resistencia).

Sensibilidad a la oxacilina.

Formación de lévanos.

Crecimiento en med Mitis salivarius.

Crecimiento med Bornes.

Método serológico Lancefield.

6.2.2.3.1. Alfa hemolisis.

A) En agar sangre.

Realizar la siembra del Streptococcus viridans sobre la superficie de placa de agar sangre, en estrías paralelas, se incuba a 37°C. Observar al cabo de 24-48 horas.

La degradación incompleta de la hemoglobina forma alrededor de las colonias un enverdecimiento característico, denominado alfa hemolisis.

B) En agar chocolate.

Por calentamiento de la sangre en la preparación de este medio se produce la desintegración de los hematíes, liberándose así la hemoglobina y con ello se facilita su utilización por estos microorganismos.

La siembra se debe realizar en estrías paralelas y deben incubarse a 37°C en anaerobiosis, observando el crecimiento al cabo de 24-48 horas.

La alfa hemolisis en este medio se observa fácilmente.

6.2.2.3.2. Crecimiento en agar sangre con cristal violeta.

El cristal violeta actúa en pequeñas concentraciones como inhibidor de numerosos microorganismos Gram positivos, mientras que los Streptococcus viridans no resultan dañados.

Se siembra en superficie y se incuba a 37°C. Al cabo de -

24-48 horas se observa el crecimiento.

6.2.2.3.3. No crecimiento en agar MacConkey.

Las sales biliares y el violeta cristal inhiben numerosos microorganismos Gram positivos. La lactosa con el indicador de pH rojo neutro, sirve para la demostración de la fermentación de la lactosa.

El crecimiento del Streptococcus viridans es inhibido por este medio.

6.2.2.3.4. No hidrólisis en agar esculina.

La hidrólisis del glucósido en glucosa y esculetina y su posterior reacción con el hierro se manifiesta por una coloración oscura sobre la superficie.

Incubando a 37°C durante 24-48 horas los cultivos, para el caso del Streptococcus viridans no se manifiesta esta hidrólisis.

6.2.2.3.5. No resistencia al calor.

Se prepara un cultivo de 5 c.c. en caldo nutritivo de la muestra.

A las 24 horas de incubación a 37°C se siembra en la mitad de una placa de agar sangre.

Después de tomada la muestra para sembrar, se calienta el tubo de cultivo a 60°C a baño maría durante 20 minutos. Con este cultivo se siembra la otra mitad de la placa de agar --

sangre. Se incuba la placa a 37°C durante 24 horas.

En el caso de ser un cultivo de Streptococcus viridans solo se presentará crecimiento en la primera mitad de la placa sembrada por no resistir este microorganismo la acción del calor.

6.2.2.3.6. Prueba de la solubilidad en bilis.

Esta prueba sirve para diferenciar los neumococos de los estreptococos alfa hemolíticos.

El Streptococcus pneumoniae es sensible a los cambios de tensión superficial, que es reducida por la actividad de las sales biliares, no ocurre lo mismo con los estreptococos alfa hemolíticos.

Para la prueba se siembra en caldo glucosado y se utiliza un cultivo de 18 horas.

Se numeran tres tubos colocando en cada uno de ellos 0,5 c.c. de cultivo. A los tubos 1 y 2 se les agrega una gota de hidróxido sódico N/2 para evitar la precipitación de las sales biliares por estar a pH inferior a 6,5.

Al tubo 1 se le agrega una gota de la solución de desoxicolato sódico al 10 %.

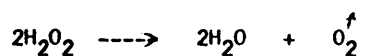
La reacción positiva se aprecia por el aclaramiento del cultivo en el tubo 1 y ocasionalmente en el tubo 2.

Incubar los tubos durante 1 hora, en baño maría a 37°C antes de considerar negativo.

6.2.2.3.7. Actividad catalásica.

Consiste en detectar la producción de la enzima catalasa.

En presencia de la catalasa, el peróxido forma burbujas:



La reacción se puede hacer en porta o en tubo.

Reacción en porta.

Agregar a una colonia aislada en el porta una gota de --
 H_2O_2 de 30 volúmenes de preparación reciente.

Reacción en tubo.

Colocar en un tubo pequeño (120 x 8 mm.) 1 a 2 c.c. de --
agua destilada o agua de peptono. Emulsionar una cantidad su-
ficiente de cultivo puro para obtener una suspensión espesa.

Añadir 2 ó 3 gotas de agua oxigenada de 30 volúmenes; no_
agitar; la presencia de burbujas de gas indica la presencia_
de una catalasa.

6.2.2.3.8. Actividad oxidásica.

Consiste en la producción de indafenol (citocromo) oxida-
sa.

Enzima oxidasa + reactivo \longrightarrow producto púrpura.

En el centro de un pequeño papel de filtro (Watman 1) co-
locado sobre una lámina de cristal, se colocan 2 ó 3 gotas -
de una solución acuosa al 1 % de clorhidrato de tetra-metil-

"

parafenileno-diamina.

Con pipeta Pasteur se coloca en estría unas tams de cultivo (cultivo de 24-48 horas en agar) sobre el papel, impregnado del reactivo.

Una coloración violeta marrón que aparece inmediatamente, prueba la existencia de una oxidasa en el sistema enzimático del microorganismo.

6.2.2.3.9. Sensibilidad a la bacitracina.

Utilizada para diferenciar los estreptococos del grupo A_ (+) de los otros estreptococos beta hemolíticos.

Se siembra en superficie en placa de agar sangre y se deposita en el centro un disco impregnado con 2, 5 ó 10 unidades (Oxoid) de unidad de bacitracina. Incubar a 37°C y se observa a las 24 horas.

Si hay halo de inhibición alrededor del disco, el estreptococo es del grupo A.

6.2.2.3.10. Sensibilidad a la oxacilina.

La técnica es la misma y el disco es de 2, 5 ug de oxacilina (Oxoid).

6.2.2.3.11. Resistencia a la optoquina.

Utilizada para diferenciar el Streptococcus pneumoniae de los estreptococos alfa hemolíticos, por su mayor sensibilidad a la optoquina (clorhidrato de etilhidrocupreina).

Una concentración de 1/50.000 inhibe a Streptococcus pneu
moniae mientras que a los otros estreptococos no.

Preparar discos de papel (Watman 1) de 1 cm. de diámetro.
Colocarlos en una caja Petri y esterilizarlos en autoclave.-
Secarlos en estufa a 37°C.

Repartir en cada disco una gota de solución de optoquina_
al 1/100 en agua destilada. Secar.

El microorganismo a estudiar se siembra en estrías parale_
las sobre la superficie de una placa de agar sangre.

Se coloca un disco sobre las estrías. Se incuba a 37°C.

El Streptococcus viridans es resistente a este reactivo.

6.2.2.3.12. Formación de lévanos (Oxoid).

Utilizamos esta prueba para demostración de dextrano y lé_
vano por el Streptococcus viridans.

Se realiza la siembra a partir de estrías de un cultivo -
reciente. Se incuba a 37°C y al cabo de 48 horas aparecen --
unas colonias que a través de los días van tomando un espec-
to de cera característico.

6.2.2.3.13. Crecimiento en medio mitis salivo- - rius (Oxoid).

Al sembrar en este medio e incubar a 37°C aparecen sobre_
la coloración azul del medio las colonias de Streptococcus -

viridans y micoplasmas, con un azul oscuro intenso que permite su diferenciación.

6.2.2.3.14. Método serológico.

Esta prueba está basada en la existencia, en la mayoría de los estreptococos de un constituyente bacteriano de naturaleza polisacárida llamado poliosido C ó sustancia C, cuya estructura química varía de unas especies a otras. Actualmente se reconocen 18 grupos conteniendo cada uno un polisacárido particular.

Método de Lancefield.

Sembrar la cepa en 100 c.c. de caldo glucosado. Incubar - 48 horas a 37°C. Centrifugar. Emulsionar el sedimento en - - 1,5 c.c. de ácido clorhídrico N/5 y calentar a 100°C a baño maría durante 10 minutos. Centrifugar y neutralizar el sobrenadante con sosa 1/5 N en presencia de rojo de fenol.

La reacción antígeno anticuerpo es una reacción de precipitación. Consiste en repartir en una serie de tubos capilares de vidrio, unas gotas de los distintos antisueros (Difco). Se tapa un extremo del tubo con plastilina y por el otro lado se introduce unas gotas del extracto problema obtenido. - Se deja en contacto 5 minutos.

En el tubo donde se corresponde el polisacárido del estreptococo y los anticuerpos del antisuero, aparece un anillo de precipitación en la zona de contacto de ambos.

7. Métodos de tinciones.

Existe gran dificultad en la realización de las tinciones de estos microorganismos debido a la carencia de pared, por lo que toman difícilmente los colorantes habituales, y por su fragilidad se trocean fácilmente.

7.1. Tinciones en medio líquido.

7.1.1. Coloración Gram.

1º. Preparar la extensión, dejarla secar, fijar con calor muy suave.

2º. Aplicar la solución de violeta oxalatada durante 60 segundos.

3º. Lavar con agua abundante, escurrir el excedente de líquido.

4º. Bañar con solución yodo yodurada de lugol durante 60 segundos.

5º. Lavar con agua abundante.

6º. Inundar con alcohol de 95º. Inclinar el portaobjetos moviéndolo hacia adelante y hacia atrás durante 30 segundos.

7º. Lavar con agua abundante.

8º. Aplicar la solución de safranina durante 45 segundos.

9º. Lavar con agua abundante.

10º. Dejar secar al aire o secar con papel.

Mirar con objetivo de inmersión.

7.1.2. Coloración Giemsa.

1º. La extensión secada al aire se fija durante 30 minutos con alcohol absoluto, 0,5 minutos con alcohol metílico y después dejar secar.

2º. Se tiñe durante 20 a 30 minutos con una solución de 10 gotas de solución Giemsa complementada hasta 10 c.c. con agua destilado pH 7,2.

3º. Se lava la extensión con agua destilado.

4º. Se seca al aire en posición vertical.

7.1.3. Coloración May-Grünwald.

1º. Se gotean 0,5 c.c. de la solución de May-Grünwald sin diluir sobre la extensión no fijada y secada al aire. Se deja actuar durante 3-5 minutos.

2º. Se añade la misma cantidad (0,5 c.c.) de agua destilado (pH 7,2) y se mezcla cuidadosamente con la solución colorante aplicada, moviendo el portaobjetos. Dejar durante 5-10 minutos.

3º. Lavar con agua destilada (pH 7,2) hasta que la extensión tome tonalidad rosa pálido.

7.1.4. Coloración simple.

1º. Extender con asa de platino el cultivo sobre el porta.

2º. Secar sin colentar.

3º. Cubrir con el colorante durante los siguientes tiempos:

- a) Fuchina fenicada de 15 a 30 segundos.
- b) Cristal violeta de 30 a 45 segundos.
- c) Azul de metileno de 3 a 5 minutos.

4º. Lavar con agua con suavidad.

5º. Observar con objetivo de inmersión.

7.1.5. Coloración Loeffler.

1º. Depositar la suspensión en el porta.

2º. Aplicar solución de azul de metileno Loeffler y dejar
la actuar de 3 a 5 minutos.

3º. Lavar con agua destilada y secar.

4º. Observar con objetivo de inmersión.

7.2. Tinciones en medio sólido.

Las colonias crecidas en medio sólido pueden ser observadas directamente en las placas a través del microscopio este reoscópico Wild M5, observándose el crecimiento sobre el - - agar o a través de objetivo de inmersión de colonias aisladas colocadas entre porta y cubre. ^{Dibujo}

7.2.1. Tinción Dienes.

Seguimos el método de Dienes (1967).

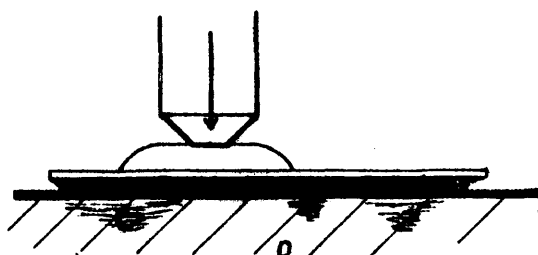
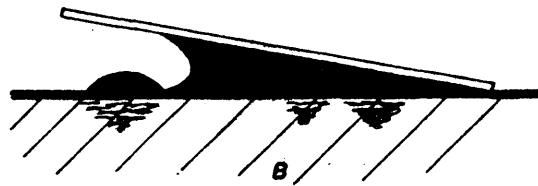
Técnica.

A) Fijación.

Los cultivos son expuestos toda la noche, o mejor, duran-

-97-

Observación microscópica
de colonias sobre agar



te unos días, a vapor de 8 gotas de una solución de formaldehido al 37 %, colocado sobre un papel de filtro situado en la tapa de una placa Petri (invertida).

Las placas se cierran o guardan en un recipiente cerrado para evitar la difusión del formaldehido.

B) Preparación de cubres teñidos.

Para ello podemos utilizar Azur II, Azul de toluidina, -- tionina y safranina.

La tinción más recomendable es con azul de toluidina.

Un asa de azul de toluidina acuosa al 2 % se mezcla sobre un cubre (24 x 40 mm.) con un asa de una solución al 20 % de ácido tartárico y se extiende con suavidad sobre el cubre.

Después de seco es ligeramente frotado con un trozo de papel de filtro para acelerar la cristalización del ácido tartárico.

En el caso de realizarse la tinción con safranina, 2 c.c. del colorante se disuelven con calentamiento en una solución al 20 % de ácido tartárico; esta solución gelifica al enfriarse, pero con suave calentamiento se licua.

Se colocan dos asas de esta solución sobre los cubres calentados a 50°C y después de secos, como en los otros colorantes, se frota con papel de filtro.

C) Preparación y tinción de rebanadas de agar con organismos.

Se cortan finas rebanadas de la superficie del agar en --

"

las que está el crecimiento, después de su fijación con formalina.

La utilización para los cortes de hoja de afeitar da buenos resultados.

Las finas rebanadas de agar se colocan sobre el cobre, teñido y calentado, el cultivo colocado sobre la tinción. Esta preparación debe hacerse con rapidez para evitar el secado.

Para que no se separe la película del agar del cobre, se monta en un porta con bálsamo del Canadá, tocando los bordes de las láminas con el bálsamo, sobre todo en los casos en -- que el medio tiene más del 1,15 % de agar, o si la rebanada no es lo suficientemente fina.

Es de sumo cuidado no presionar las copas de agar, pues -- las colonias son fácilmente deformadas.

Durante todo el proceso es muy interesante mantener la -- temperatura de 50-60°C.

El método más simple para mantener esta temperatura es colocar en la mesa de trabajo un flexa con una bombilla de -- 100 W., o bien estufa de 50°C.

7.2.2. Tinción de colonias para técnica de fotogra-
fía.

1º. Preparar cubreobjetos, con un hisopo de algodón for--mando una fina capa y uniforme de colorante Dienes, dejar -- secar.

2º. Cortar un taco de 1 cm. cuadrado, del agar que conten
ga las colonias sospechosas que se van a teñir.

3º. Colocar este taco sobre un portaobjetos, con el lado_
que contiene las colonias hacia arriba.

4º. Colocar un cubreobjetos, con el lado con colorante ha
cia abajo, sobre el agar.

5º. Examinar con objetivo de inmersión después de 15-20 -
minutos.

6º. Para conservar la preparación, conviene sellar el cu-
breobjetos al portaobjetos con parafina fundida.

171 .

IV. PARTE EXPERIMENTAL

1. MICOPLASMAS.

Introducción.

Al iniciar la tesis comenzamos por conocer los microorganismos de nuestro estudio, para lo que utilizamos las técnicas generales de diversos autores, encontrados en la bibliografía y los describimos en el capítulo de materiales y métodos.

Pero cuando efectuamos modificaciones en las técnicas ya descritas, obtuvimos algunos resultados que agrupamos y describimos en nuestra parte experimental, formando los siguientes apartados:

- A) Conservación - congelación.
- B) Envejecimiento.
- C) Variaciones morfológicas.
- D) Disgregación.

Parte general.

Microorganismos.

Mycoplasma pneumoniae; Mycoplasma fermentans; Mycoplasma hominis; Mycoplasma orale tipo 1; Mycoplasma salivarium; Mycoplasma cepa I (Mycoplasma urealyticum); Mycoplasma laidlawii de nuestra colección.

MEDIOS.

Líquidos: Hayflick específicos de crecimiento. Medios de --
identificación y conservación.

Medio bifásico.

Sólidos: Específicos de crecimiento, identificación y con
servación.

Tinciones:

Aparte del método general de tinción de micoplasmas, es --
decir, del método Dienes, nosotros ensayamos las tinciones:

Gram; May-Grünwald; Giemsa; Cristal violeta; Tionina.

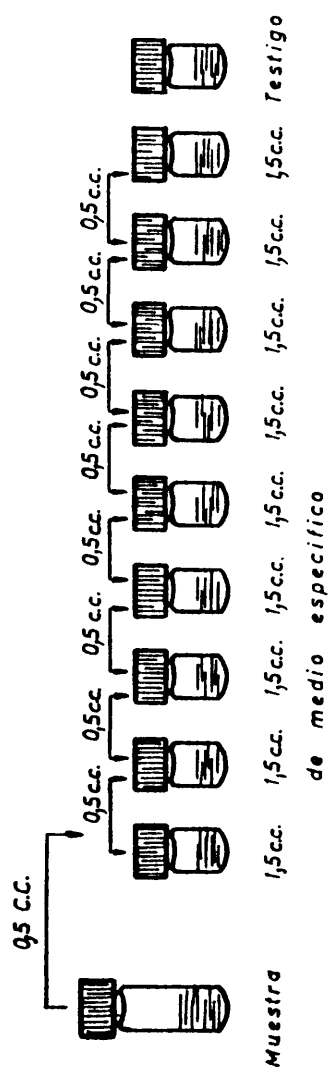
Las tinciones se realizaron de extensiones de los cultivos
líquidos o de cortes del agar de cultivo entre cubre y porta
métodos Fallon y Witlestone (1969).

Observación.

Lupa estereoscópica; microscopio ordinario; fotomicroscopio Zeiss.

Técnico.

Las siembras en medio líquido se realizaron por el sistema de diluciones en serie: formamos una serie de 10 frasquitos de vidrio de 2 c.c. de capacidad y cierre con tapón de --
rosca, al añadir 1,5 c.c. de medio específico para cada micoplasma y 0,5 c.c. de inóculo y cerrar con tapón de rosca la cámara de aire que queda en el interior del tubo es mínima --



pues estos microorganismos requieren anaerobiosis.

Las diluciones en serie se realizan de la forma siguiente:

Siembra de 0,5 c.c. de muestra en 1,5 c.c. de medio líquido, en el primer tubo. Tomamos 0,5 c.c. de este tubo y lo ponemos sobre 1,5 c.c. de medio del segundo tubo, así hasta el tubo 9; el tubo a froquito número 10 es testigo.

Las diluciones formadas en nuestro estudio son:

1/3; 1/12; 1/48; 1/192; 1/768. Así formamos una serie con distintas concentraciones de crecimiento en un mismo número de días de incubación, esto nos permite utilizar el tubo más adecuado en cada momento de cultivo según sea para resiembras, tinciones, colección, etc.

El crecimiento se visualiza por el cambio de color que aparece en el medio de cultivo, ya que estos medios contienen un indicador que varía su coloración según la variación de pH que presenta cada microorganismo en su metabolismo.

Las siembras en medio bifásico se realizan inoculando 1 gota a una tomo de colonia de la muestra y se deposita sobre el líquido que constituye este medio.

La incubación, tinciones, conservación, etc., se hacen de la misma manera que en el método anteriormente descrito.

Después de la incubación de los tubos a 37°C, un número de días según el microorganismo, realizamos los siguientes ensayos con el tubo número 1 de cada serie:

-105-

- a) resiembras en medio líquido para formar nueva serie.
- b) tinciones.
- c) siembra en placas.
- d) pruebas de identificación.

Al comprobar el crecimiento en medio líquido, pasamos a las siembras en placa por inundación de la superficie con -- 1 c.c. de inóculo y retirada del sobrenadante con pipeta al_ cabo de 15 minutos. Realizamos este sistema de siembra por-- que en los ensayos según las técnicas generales comprobamos_ que sembrando con asa de platino o con cayada de vidrio, los crecimientos de estos microorganismos aparecían muy trocea-- dos, mientras que las siembras efectuadas por el sistema ci-- tado no presentaban roturas ni desgarros en el crecimiento - de colonias.

De cada serie se toma 1 tubo para conservar colección en_ nevera.

Las incubaciones de las placas se realizaron a 37°C en am_ biente CO₂ creado por el sistema Gaspak.

Con los crecimientos en placas se realizaron:

"

- a) tinciones.
- b) pruebas de identificación.
- c) colección.

A) Conservación - Congelación.

Los muestras de micoplasmas patrón se conservaron liofilizadas o en cultivos en medio Loeffler o Hayflick específicos, a -20°C en nevera. Con las muestras se hicieron 2 series. -- Unas que cada 6 meses se volvían a resembrar, realizando las pruebas de crecimiento e identificación para cada uno de los microorganismos, y otros que se mantuvieron sin utilizar para comprobar a los 2 años su conservación.

B) Envejecimiento.

En este trabajo tratamos de observar las modificaciones - ocurridas en los cultivos de micoplasmas cuando se les mantienen durante varios días en incubación, hasta el agotamiento de los medios de cultivo y la destrucción de sus formas - morfológicas.

Tanto en los medios de cultivo líquidos como sólidos, formamos dos ensayos: serie con ausencia o adición de 6.666UI/c. de penicilina G sódica. De tal manera que las series líquidas sin penicilina se siembran en placas sin penicilina y los series líquidas con penicilina se pasan a placas con penicilina.

Comenzamos por realizar varios resiembras en medios líquidos para pasar a placas microorganismos jóvenes.

C) Variaciones morfológicas.

En las pruebas de comprobación de esterilidad e identificación de las muestras patrón de micoplasmas conservados a -20°C en medio Hayflick durante 2 años, nos encontramos con modificaciones que nos sugirieron el siguiente trabajo: comprobación de las variaciones ocurridas en las muestras conservadas durante 2 años a -20°C .

Técnica.

Tomamos un tubo de cada muestra de las que no se habían utilizado nunca y las sembramos en los medios líquidos y sólidos específicos, utilizando los métodos ya descritos.

Desdoblamos cada serie de cultivos líquido y sólido en dos, según que el medio presentara o no penicilina (6.666UI/c.c.).

Para los cultivos en medio líquido se hicieron cada 5 días nuevas series, en un total de 5 series para cada microorganismo (25 días).

Las placas se incubaron hasta 30 días. Efectuándose las siembras de cada serie con líquidos de tubo 1 y 2 para cada microorganismo.

D) Disgregación.

Tratamos de comprobar las modificaciones que sufren los micoplasmas por la acción del agua destilada, de distintas concentraciones de sales (cloruro sódico) y por el efecto de la centrifugación.

Técnica.

Realizamos lecturas de densidades ópticas en espectrocolorímetro, tinciones y siembras en placas con los líquidos de cultivo jóvenes de micoplasmas.

Separamos el trabajo en los siguientes ensayos:

- 1) Acción del agua destilada.
- 2) Acción de los distintas disoluciones de cloruro sódico.
- 3) Efecto de la centrifugación.

1) Añadimos 10 c.c. de agua destilada estéril sobre 10 c.c. de cultivo de cada micoplasma en su medio Hayflick específico.

2) Añadimos 10 c.c. de disoluciones de cloruro sódico en concentraciones 0,9 %, 2 % y 8 % formando una serie de 4 tubos y un testigo para cada caso en cada cultivo joven.

Dejamos en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente, al cabo de la cual se realizan lecturas de densidades ópticas, tinciones y siembras en placas con estos líquidos.

3) Se centrifugan cultivos jóvenes de micoplasmas en sus medios líquidos específicos de crecimiento a 27.000 r.p.m. -

durante 20 minutos. Recogemos el sedimento y formamos con él una extensión sobre portaobjetos. Teñimos con el método Gram y Dienes. Con el líquido de centrifugación sembramos en las_ diferentes placas.

2. INDUCCIÓN DE FORMA L.

Antecedentes.

Cuando un microorganismo es sometido en un cultivo a unas condiciones especiales, pueden aparecer modificaciones en su morfología y biología, entre las que se encuentran, la pérdida de la pared celular, conduciendo a una distorsión o pleomorfismo en ese microorganismo.

A veces, este pleomorfismo constituye un estadio entre la forma normal y la forma final de la vida de la bacteria, pero, en otras ocasiones, constituye ya una fase estable.

Se designa con el término "forma o fase L" de una bacte--ria, a la variante morfológica de las bacterias que crecen y se multiplican en medios especiales a manera de partículas - muy pequeñas o formas globosas pleomórficas, caracterizadas_ por tomar con dificultad los colorantes. En general, si al - cesar sobre ellas la acción del agente inductor no revierten a la bacteria de origen, son consideradas como formas o fa--ses L estables.

Se puede decir que ha existido inducción a forma L cuando coexisten estos caracteres:

- a) desaparición de la integridad de la estructura de la pared.
- b) evitación de la lisis osmótica.
- c) multiplicación de las formas obtenidas.

Ahora bien, los sáculos de peptidoglicano de la pared pueden verse afectados a evitar su formación o a disgregar los ya formados.

La transición de la forma bacteriol a la fase L está determinada por dos grupos de factores:

- a) las características de las especies.
- b) las condiciones experimentales.

Existen, pues, gran número de medios de crecimiento de estas formas, pero el poder llegar a reunir un sistema inductor depende de la relación de la especie bacteriana con la acción del agente inductor para lograr el efecto final buscado.

Esta pluralidad de factores ha dado lugar a numerosos trabajos, de los que citaremos algunos.

Para inducir la forma L de Streptococcus pneumoniae y Neisseria gonorrhoeae, Madoff y Dienes (1958) utilizan como estabilizador osmótico la sacarosa, comprobando que es útil; pero, si se incorpora cloruro sódico no se logra la induc-



ción en estos microorganismos. Condiciones distintas son las dadas en 1972 por Bibel y col. para estreptococos, y en 1973 por Bacigalupi para Neisseria gonorrhoeae.

En el caso de Escherichia coli se ha demostrado que no -- hay inducción añadiendo fosfato al agar, pero se logra una -- gran producción o crecimiento utilizando sacarosa (Hijmans y Dienes, 1955).

El Streptococcus del grupo viridans, no sigue la regla general de las bacterias Gram positivas de ser inducidas a forma L incrementando el contenido de cloruro sódico del medio, siendo la producción mayor cuando se utiliza fosfato (Hayflick, 1969).

Una posible lisis osmótica puede ser evitada por "estabilización" de la membrana de la célula, lográndose esto con el uso de iones de magnesio en dosis mínimas, creándose protoplastos más resistentes a la variación osmótica y mecánica. Esto ha sido probado en Escherichia coli y neumococos.

Según Landman y Tinoza (1961) la anoerobiosis es un factor, a veces esencial, en la inducción, como en el caso de salmonellas y estreptococos hemolíticos, pero no es necesaria en los subcultivos de la Forma L. Se puede afirmar lo mismo para el factor pH del medio.

Para los sueros se ha comprobado, por ejemplo, que en Neisseria gonorrhoeae se puede utilizar el suero de caballo, pero no el de conejo, ni el humano.

Tulasne y Brisou (1955) demostraron que la acción de ciertas vitaminas suplen las proteínas animales, llegando Tulasne a afirmar: "Las formas L fijo de las bacterias son indistinguibles de los organismos conocidos como organismos del tipo de la pleuroneumonía (OTPP)."

De igual forma que el agar blanco y la utilización del suero favorecen el crecimiento de la forma L, el agar endurecido combinado con menor cantidad de suero favorece la reversión a la forma bacteriana. Landman y col. (1968) obtuvieron la reversión de Bacillus subtilis a la forma L por reducción de la disminución del suero y aumentando el agar al 20 %.

El extracto de levadura (Marston, 1961) y la yema de huevo (Schmitt - Slomskay y col. 1967) ayudan a la reversión.

Grasset y Bonifas (1951) y Dienes (1971), describen las -

formas L de las Enterobacteriaceas y del Proteus logradas --
gracias a la acción de la penicilina. Como agentes inducto--
res podemos citar la lista siguiente:

AGENTES INDUCTORES PARA LA OBTENCIÓN DE FORMA L DE
BACTERIAS

Agente inductor	Organismo	Referencia
Penicilina	S. aureus Streptococcus A,B,G. P. vulgaris.	Dienes Sharp (1956)
Bacitracina	S. pyogenes N. meningitidis	Gooder Moxted (1961) Roberts (1967)
Cefalotina	N. meningitidis	
Vancomicina	N. meningitidis	Roberts (1967)
Ristocetina	N. meningitidis	
D- cicloserina	S. pyogenes S. typhosa	Michel y Hijmans (1960) Dienes y col. (1950)
Glicina	S. pyogenes S. faecalis	Freimer y col. (1959) Bleiweis y Zimmerman (1961)
Lisina (grupo C) ...	B. subtilis M. tuberculosis	Landman y Halle (1963) Willet y thacore (1966)
Lisozima	S. aureus S. typhosa	Watanakunakorn y col.(1969) Dienes y col. (1950)
Lisostafina	V. cholerae	
Anticuerpo		Ionetta y Wedgwood (1960)
Complemento		

Norris J.R. y Ribbons D.E.: Methods in microbiology, 1972. -
Vol. 7A.

Academic Press London and New York.

Existen sustancias que disuelven la mureina existente, como la lisozima, que cataliza la unión entre el ácido murámico y la N-acetil-glucosamina. Ahora bien, las distintas especies tienen diferentes respuestas para la acción de la lisozima.

Landman y Halle (1963) utilizan la lisozima para el Bacillus subtilis y King y Gooder (1965) para Streptococcus faecalis, pero, encuentran dificultad en la obtención de sus formas L.

Los aminoácidos también pueden actuar como agentes inductores; así, la glicina en medios hipertónicos es utilizada en los tratamientos de Salmonella y Haemophilus influenzae, tal vez por la sustitución en la cadena del ácido murámico. Rubio-Huertos, Beltrá y Santaolalla (1972) obtienen una forma L estable de Agrobacterium tumefaciens, después de 40 pases en medio sólido que contenía 4 % de glicina.

Pérez-Ureña, Espinosa, Barasoain y Portolés (1974) llegan a la inducción de esferoplastos por la acción de EDTA, lisozima y antibióticos que actúan a nivel de pared celular, comprobando que la acción decrece en este orden: penicilina, bacitracina, novomicina y fosfomicina, lo que parece demostrar que la formación de esferoplastos está más favorecida por los antibióticos que actúan en las últimas fases de polimerización del mucopéptido, que por los que intervienen en las fases anteriores de la síntesis de la pared. Igualmente com-

prueban que la inducción depende de la dosis, de la naturaleza del antibiótico y del momento de crecimiento del microorganismo.

Tratando primero con EDTA y luego con lisozya se pueden aislar cubiertas de la capa de Escherichia coli K 12 y mediante pruebas estructurales y químicas, Corao, Serrano, Leal y Muñoz (1974), demuestran la ausencia de la capa de peptidoglicano (mureina), denominando a estas fracciones "fantasmas", a las que Braude (1970) había denominado "formas blondas".

Existe el caso sencillo ya que Poetschke ha producido forma L de Corynebacterium (difteroides) simplemente exponiéndoles al suero humano normal, lo que en cierto modo puede explicar la presencia frecuente en el laboratorio de casos de endocarditis bacteriana subaguda producida por difteroides de curso persistente y resistente a la penicilina.

En nuestro trabajo tomamos como agente inductor la penicilina, pues es el antibiótico que se agrega a los medios de cultivo utilizados en el crecimiento de micoplasmas, para poder ya fijar un factor constante en los cultivos de micoplasmas y forma L, tema de nuestro trabajo.

De este agente inductor se sabe que el momento de añadirle a los cultivos es importante, pues en el caso del Proteus, por ejemplo, si se añade la penicilina al final de la fase logarítmica, se induce el 10 % de bacterios, mientras que, cuando

do el antibiótico es añadido al principio, la inducción es mínima.

La concentración de penicilina es interesante, como en el caso de los neumococos o de los estreptococos hemolíticos, - que con concentraciones mínimas inhibitorias se obtuvieron directamente colonias de forma L.

Por ello Gilain y Stadtsboeder (1971) llegan a afirmar -- que la producción "in vitro" de colonias L depende de la sensibilidad de la cepa original: los Staphylococcus aureus más sensibles producen un mayor número de colonias L. Inversamente, los estafilococos poliresistentes no se transforman apenas en forma L con las tasas normalmente utilizadas.

Boris y col. (1969) muestran que los estafilococos producen una sustancia capaz de inhibir el desarrollo de las formas L "in vitro".

Parece, pues, que en caso de infección es suficiente que una parte de la población microbiana resista el antibiótico para inhibir la transformación a forma L, presentándose, por ello, a veces, problemas terapéuticos.

De igual forma que existen una gran cantidad de medios, - microorganismos y agentes inductores citados por los autores, también existen diversidad de formas obtenidas en estos cultivos, dando lugar a gran variedad de términos para designar las formas encontradas, que contribuyen a dificultar la obtención de conclusiones semejantes.

Ya en 1894, Pfeiffer, en sus estudios sobre Vibriun chole
rae encuentra formas que las designa como forma L.

Hoffstordt y Yourmons (1932) describen las colonias G.

Klieneberger-Nobel en 1935 denomina formas L a las obteni
das de su Streptobacillus moniliiformas, estableciendo en - -
1949 su origen y significado y en 1951 su ciclo entero.

Eagle en 1948 publica unos trabajos sobre la penicilina,-
describiendo el "fenómeno paradójico de zona".

Weibull en 1953 introduce el término "protoplasto", tomón
dolo de la botánica, para unos microorganismos obtenidos en_
su laboratorio.

Brown y col. (1971) denominan las formas A y E de proto--
plastos obtenidos de Clostridium botulinum.

Por toda esta diversificación, conviene realizar una bre-
ve descripción de los términos encontrados, a manera de orien
tación.

Protoplasto.

Célula osmóticamente frágil, sin pared celular. No puede_
multiplicarse, pero puede aumentar de tamaño.

El análisis antigénico de los protoplastos revela la au--
sencia de ciertas fracciones antigénicas que existían en la_
pared de la bacteria de origen.

El análisis químico permite contrastar la ausencia de - -
ciertos cuerpos químicos, reunidos por Salton (1953) bajo el

nombre de "complejo mucoide", siendo el más conocido el ácido diaminopimélico.

Todos los investigadores admiten, en efecto, que los protoplastos son incapaces de reproducir bacterias de origen, -
pues son incapaces de sintetizar una pared nueva, incluso si se les provee del material químico adecuado.

Presentan la imposibilidad de reproducirse en medios sólidos.

Brenner y col. (1958) sugieren que todas las formas granulares que crecen en los procesos de inducción son potencialmente reversibles, existiendo a la vez protoplastos y esferoplastos que presentan únicamente una membrana citoplasmática; por tanto los antígenos de la pared celular están ausentes o modificados. Esto mismo era demostrado por Tulosne y Brisou (1955), cuando observan la disminución del antígeno O para Proteus vulgaris, mirabilis y Salmonella.

Esferoplastos.

Células cuya pared celular está parcialmente alterada y -
ha perdido total o parcialmente su rigidez.

Louria (1971) encuentra, en sepsis crónicas, estas células conjuntamente con formas L y formas que él designa como "formas aberrantes."

Esta persistencia de una parte de la pared, permite a los

esferoplastos absorber ciertos fagos. Algunos fagos tienen lisinas que pueden producir crecimiento de forma L "in vitro". Así cultivos infectados con fagos dieron lugar a la formación de crecimiento de forma L. Es posible que este mecanismo ocurra también "in vivo", lo que podría explicar la evolución de algunas infecciones crónicas.

Por contar con parte de pared presentan el poder de división directa y la posibilidad potencial de sintetizar de nuevo la pared completa, o sea la reversión hacia la forma bacteriana de origen.

La estructura de los esferoplastos ha sido estudiada por Weis en 1973 para los de Pseudomonas aeruginosa.

Colonia G.

Compuesta de elementos granulares. Son colonias muy pequeñas, a veces puntiformes.

Formas L.

Para las formas L hemos recopilado las designaciones y opiniones en las que se basan el mayor número de autores para describirlos.

Dienes las divide en dos tipos: a) forma L de tipo A, b) forma L de tipo B.

a) Forma L de tipo A: se desarrolla sobre los mismos me--

dios que las bacterias de origen.

1) Aspecto general sobre medios sólidos de estos formas.

Tienen un diámetro de 2-5 um. Centro incrustado y aureola más o menos marcado, delgada y transparente.

2) Exámen microscópico de las colonias.

a) Con controstes de fases.

Están formadas por gran cantidad de elementos romos, cuerpos globosos, mostrando o veces imágenes de media luna.

En el centro de la colonia estos cuerpos globulares están amontonados unos con otros a manera de una mora.

b) Exámen citológico.

Teñidos con Giemsa se presentan como cuerpos globosos, -- formando masas con la poca uniformidad basófila ya citada -- (Levaditi y Henry en 1948). Guardan su aspecto redondeado -- cuando están poco apretados en la periferia de la colonia, y toman aspecto poligonal cuando están apretados en el centro_ de la colonia.

3) Características.

Revierten a la bacteria de origen cuando se suprime el -- agente que ha provocado su formación.

La característica de absorber fagos es mantenida por este tipo de forma L.

4) Multiplicación.

Con contraste de fases se observa la multiplicación por división directa de los cuerpos globosos. Estos son expulsados a la superficie o se acumulan y forman una aureola translúcida en la periferia de la colonia. Parece ser, pues, una adaptación temporal para las bacterias cuyo pared ha sido eliminada por el bloqueo provisional de poder sintetizarla, perdiendo el factor condicionante de la rigidez necesaria para mantener la forma habitual de la bacteria.

Forma L de tipo B: con algunas excepciones, este tipo de formas L solo se desarrolla en medios enriquecidos.

1) Aspecto general de estas formas sobre medios sólidos.

Son generalmente muy pequeñas. Su diámetro es 500 μm . Al principio de su desarrollo se presentan como pequeñas manchas aplastadas, de contornos irregulares, ligeramente incluidas en el medio. Más tarde, un cierto número de ellas se hacen un poco más grandes y redondeadas, ligeramente abombadas y alcanzan la superficie.

2) Aspecto microscópico.

a) Contraste de fases.

Cuando son jóvenes están constituidas por granulaciones muy finas (de 250-500 μm , agrupadas por parejas. Estos cuerpos globosos aparecen como vacíos. Forman a menudo un peque-

ño collar alrededor del centro granuloso de la colonia.

b) Exámen citológico.

Teñidos por Giemsa, las granulaciones y los cuerpos globosos aparecen como elementos enteramente basófilos.

3) Características.

Las formas L de tipo B son estables. No revierten hacia las bacterias de origen, incluso cuando se le suprime el agente inductor. Su cultivo es inhibido por los antisueros correspondientes, realizándose en 1973 por Watanabe, un test serológico de la fase L. No poseen el poder de absorber fagos.

Las granulaciones, de las que están constituidos, pasan a través de las membranas filtrantes, midiendo 250 μ m. según Tulasne (1950) y Lovillaurex (1956).

Wyrick y col. (1973) realizan un estudio de estas formas con nuevos métodos genéticos.

TRABAJO DE INDUCCIÓN

Las técnicas de inducción se montan en dos trabajos:

- 1) Inducción de forma L "in vitro".
- 2) Inducción de forma L "in vivo".
- 1) Inducción de forma L "in vitro".

Para realizar nuestro trabajo de inducción de forma L "in vitro" de Streptococcus viridans, realizamos los ensayos siguientes:

- A) Inducción en medio sólido.
- B) Inducción en medio líquido.
- C) Inducción en medio bifásico.

A) Inducción en medio sólido.

Se trata de someter al Streptococcus viridans a la acción del agente inductor cuando está creciendo en medios sólidos.

Partimos de crecimientos recientes, formando colecciones_ para posteriores comprobaciones.

Microorganismo.

Streptococcus viridans 38487 y 38566 de nuestra colección.

Medios.

Líquidos: Tood-Hewitt y los de identificación.

Sólidos: Agar 1,5; agar 0,8 % y los de identificación ya_ descritos en el capítulo de materiales y métodos.

Métodos.

Tomamos una colonia de Streptococcus viridans de crecimiento de 24 horas en placa de agar sangre y la sembramos en medio Tood-Hewitt. Incubamos a 37°C durante 24 horas, al cabo de los cuales realizamos las resiembras en placas de agar mediante inundación de la superficie de las placas con el -- caldo de cultivo y retirado del sobrenadante al cabo de 15 - minutos, con pipeta.

Incubación a 37°C, en atmósfera de CO₂, producida por el sistema Gaspak y en aerobiosis.

Realizamos tinción Grom con los cultivos líquidos y coloración Dienes para los colonias.

En cada ensayo hacemos resiembra en medios carentes del agente inductor, para comprobar en qué momento de la inducción aparecen formas estables.

Desdoblamos la inducción en medio sólido, en los siguientes apartados:

A₁) Inducción por adición de la penicilina al medio.

A₂) Inducción por adición de la penicilina en un surco -- realizado en el medio de cultivo.

A₃) Inducción por adición de la penicilina en un disco sobre la superficie del medio de cultivo.

A₄) Inducción por adición de la penicilina al medio de cultivo.

La acción del antibiótico inductor se logra de esta manera en masa, es decir, sobre las colonias que van creciendo -- sobre la superficie.

Las unidades añadidas a los medios son 6.666U /c. c. y -- 13.222U /c.c. de penicilina G sódica, por ser las unidades -- de penicilina añadidas a los medios de cultivo de micoplasmas.

La observación con lupa estereoscópica se realiza al cabo

de 2 a 4 días de incubación del cultivo.

A₂) Inducción por adición de la penicilina en un surco -- realizado en el medio de cultivo.

Sembramos las placas con un cultivo líquido de 24 horas, quitamos el sobrenadante con pipeta e incubamos 4 horas para secar la superficie. Realizamos un corte o surco en la región central con una espátula, de las placas de agar 1,5 y agar 0,8 %, según técnica de Norris y Ribbons (1972), en el que depositamos con pipeta diluciones de 6.666 y 13.222UI/c. c. de penicilina G sódica.

Al cabo de 2 a 4 días las colonias de estudio aparecen en la zona próxima al surco.

A₃) Inducción por adición de la penicilina en un disco sobre la superficie del medio de cultivo.

Realizamos la técnica habitual de antibiogramas, según procedimiento de Bauer y col. (1966), colocando un disco de papel Watman nº 2 con 6.666 y 13.222UI/c.c. de penicilina en el centro de las placas de agar 1,5 y agar 0,8 %, previamente sembradas por inundación de la superficie y retirada del sobrenadante al cabo de 15 minutos.

Así se observan con lupa estereoscópica los cambios morfológicos ocurridos en la zona de acción de estos discos.

..

B) Inducción en medio líquido.

La acción del agente inductor en este caso se realiza en cultivos líquidos. Estos crecimientos son más rápidos y para mantener la acción del antibiótico y evitar la toxicidad de los productos metabólicos formados en el crecimiento de estos microorganismos hay que realizar resiembras en series de diluciones cada 24 horas.

Mediante las series tenemos la posibilidad de tomar el tubo adecuado según necesitemos crecimiento abundante, medio o escaso, y así en cada estudio realizar fácilmente las pruebas de identificación y colección.

Curva de crecimiento

El añadir el agente inductor en un momento adecuado del crecimiento de un microorganismo es uno de los factores más interesantes del proceso de inducción, por ello comenzamos por trazar la curva de crecimiento de Streptococcus viridans en medio Todd-Hewit.

Utilizamos matraces Manod, que por su tubuladura lateral facilitan efectuar lecturas periódicas sin riesgo de contaminación.

Realizamos las lecturas de densidad ópticas en espectrocolorímetro, en una longitud de onda de 580 mμ.

Como patrón de referencia se utilizó agua destilada para poder efectuar todas las lecturas dentro de la misma longitud

de onda por la gran variación de pH que aparece a lo largo -
del crecimiento de estos microorganismos produciendo cambios
la coloración de los medios de cultivo.

T A B L A

Tiempo	Densidades ópticas
Inicial	0,119
1	0,119
2	0,131
3	0,194
4	0,252
5	0,319
6	0,398
7	0,398
8	0,387
24 horas	0,244

Por la extensión del trabajo le desdoblamos en:

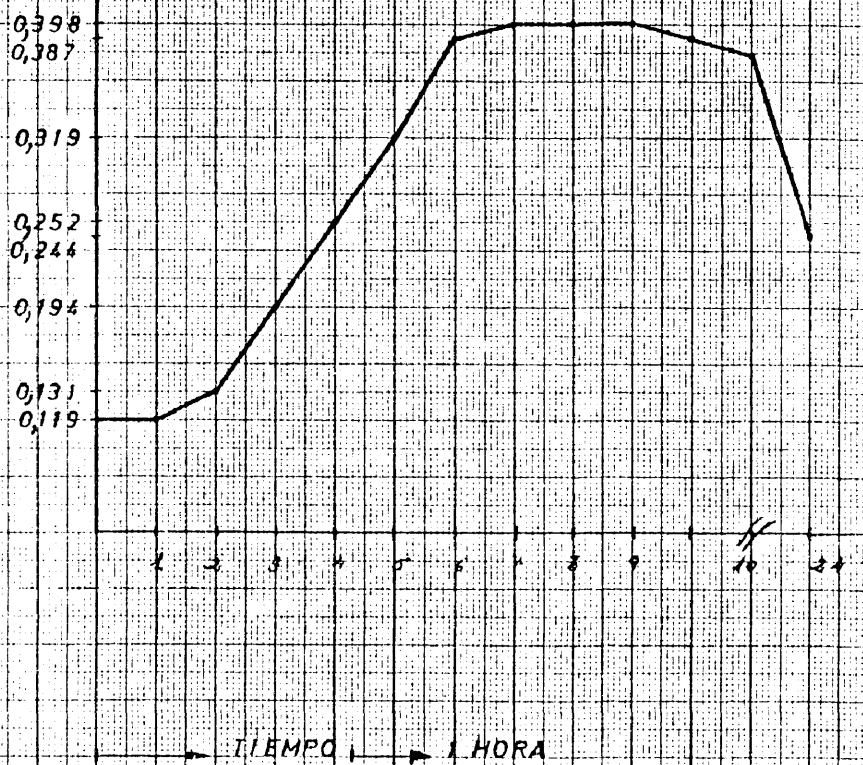
1) Inducción en medios con distintas unidades de penicili
na.

2) Inducción en medios enriquecidos.

1) Inducción en medios con distintas unidades de penicili
na.
Formamos series de tubos con medios líquidos base y Tood-

CURVA DE CRECIMIENTO -STREPTOCOCCUS VIRIDANS.

-129-



Hewitt, a los que se les añaden 6.666 y 13.222UI/c.c. de penicilina G sódica (Una serie sin adición de penicilina para control de crecimiento). Al comprobar el crecimiento se siembran los medios sólidos a los que se les han añadido las unidades de penicilina según cada caso.

Técnica.

Tomamos una colonia aislado de placa de cultivo de 24 horas en agar sangre y la llevamos a 10 c.c. de líquido Tood-Hewitt, cultivamos a 37°C y a las 24 horas leemos la densidad óptica en espectrocolorímetro. Llevamos por diluciones la lectura a 0,250 (fase crecimiento). Tomamos 0,1 c.c. y sembramos un tubo de medio líquido base y medio Tood-Hewitt con distintas unidades de penicilina, formamos las diluciones en serie.

Por llevar estos medios líquidos entre sus componentes un indicador de pH (Rojo fenol), podemos observar el crecimiento por la variación de color o viraje que aparece a lo largo de su metabolismo, por alcalinización o acidificación del medio.

Formamos 4 tubos para cada serie de distintas unidades de penicilina: uno para resiembras; uno para almacenar en nevera; otro para realizar las tinciones, resiembras y pruebas de identificación, y el cuarto tubo se dejó crecer en períodos de tiempo definidos de incubación para observar la evolu

"

ción del crecimiento y hacer las pruebas de reversión.

Se dieron 20 pases en las series que contenían 6.666/UI/-c.c. y otros 20 pases en las series de 13.222UI/c.c. de penicilina. Formando independientemente de estas dos series, una tercera en la que se dieron primeramente 15 pases en medio - con 6.666UI/c.c. y a continuación otros 15 pases en medios - con 13.222UI/c.c.; es decir, un total de 30 pases.

Estos pases se realizaron cada 48 horas de crecimiento, - pasando en todos los casos 0,1 c.c. de inóculo a 1,5 c.c. de medio estéril.

Se siembran las placas de cada serie en medios agar 1,5 %, agar 0,8 % y agar PPLO, por inundación de la superficie y retirada del sobrenadante al cabo de 15 minutos.

Incubación a 37°C en atmósfera CO₂ (5 %) siguiendo la técnica de Tulasne (1951) que recomienda anaerobiosis. Utilizamos las jarras de anaerobiosis con el sistema Gas-Pak.

Los crecimientos líquidos se observaron cada 48 horas con tinciones Gram, Giemsa y May-Grunwald, y las placas por tinción Dienes.

Sembramos en medio agar gelatina con cada muestra para en sayar la reversión.

2) Inducción en medios enriquecidos.

Para la inducción en medios líquidos encontramos en la bi bliografía las experiencias de inducción de forma L de Strep

tococcus MG de Chanok y col. (1962) en las que recomiendan -
lo utilización de un medio formado por Brucella-agar (Albi--
mi) o agar tripticasa-soja (BBL) e infusión de corazón de --
buey (Difco) suplementado con 10 % de suero de caballo y 10-
15 % de sacaroso; es decir, un medio muy enriquecido que pre-
sentaba un gran parecido con el utilizado para el crecimien-
to de micoplasmas. Por ello decidimos utilizar los medios es-
pecíficos de micoplasmas en los ensayos de inducción al ser-
el objeto de esta tesis un estudio de comparación de la for-
ma L inducida en nuestro laboratorio y los micoplasmas, e in-
cluso utilizar las mismas unidades de penicilina que se agre-
gan a éstos.

Técnica.

Tomamos una colonia aislada de placa de agar sangre y la_
llevamos a 10 c.c. de medio Todd-Hewitt, de donde tomando --
0,1 c.c. pasamos a sembrar a los medios líquidos de cultivo.
Medios Hayflick.

Realizamos las lecturas de las densidades ópticas del cre-
cimiento en los medios líquidos, utilizando 580 mμ de longi-
tud de onda (patrón agua destilada). Incubamos 24 horas es--
tas series de diluciones y sembramos en las placas de medios_
agar 1,5 %, agar 0,8 % y agar PPL0, por inundación de la su--
perficie y retirado del sobrenadante al cabo de 15 minutos.-
Incubación a 37°C en atmósfera CO₂ creada por el sistema - -

Gaspak . Comprobamos las pruebas de identificación y reversión.

C) Inducción en medio bifásico.

La inducción en medio líquido es un método lento de observación, al tener que realizar las resiembras en medios líquidos y luego pasarles a sólidos para la observación de las colonias por lo que decidimos inducir formas L en un medio denominado "bifásico".

Este medio está formado por una zona de agar nutritivo inclinado, sobre los que se añade el medio líquido (Medio líquido Todd-Hewitt; Hayflick o líquido base de inducción) -- con los diferentes gradientes de penicilina. Esto nos permite observar a la vez el crecimiento en la parte líquida, por el viraje del indicador y en el medio sólido por observación de las colonias que se van formando sobre la superficie del agar.

Por cortes del agar en pequeñas porciones, realizamos más rápidamente las pruebas de identificación, tinciones y pruebas de reversión.

Este medio fue propuesto por Norris y Ribbons en 1972, para aquellos microorganismos que por su fragilidad o tamaño -- necesitaban un soporte para su crecimiento.

Los pasos, las resiembras y tinciones en este medio, se realizaron de igual manera que los descritos para los trabajos anteriores.

2) Inducción de forma L "in vivo".

Antecedentes.

Mortimer en 1965 mostraba, que estreptococos del grupo A_ de baja virulencia, podían producir espontáneamente formas - L "in vivo" mediante una sencilla inoculación intraperitoneal en ratón.

Hryniewicz y Mated (datos sin publicar) aislaron la forma L de estreptococos del grupo A, inoculando éste a ratones en vía peritoneal; al manifestarse la infección inyectaban en cavidad peritoneal la enzima lisocima llegando a observar un gran descenso en el número de bacterias, y por el contrario un aumento de formas globosas irregulares que se identificaron como formas L.

Guze y Kalmason (1964) inocularon ratones intravenosamente, con cultivos de Streptococcus faecalis, provocándoles -- pielonefritis, de tal manera, que al tratar estos ratones -- con penicilina y sacrificarles en intervalos determinados, -- podían recoger los tejidos dañados, con los que, previa homogenización, realizaban cultivos en medios específicos de -- Streptococcus faecalis para forma L. Al cabo de 13 semanas -- de haber cesado el tratamiento con penicilina, pudieron observar que el estreptococo inoculado al ratón ya solo se podía cultivar en medios específicos de forma L.

El microorganismo había persistido en el ratón en la for-

mo, tal vez, de protoplasto sin revertir.

En nuestro trabajo tratamos de obtener formas L de Streptococcus viridans mediante inducción "in vivo"; es decir, -- que la acción del agente inductor sobre el microorganismo de estudio se efectúe en el interior del animal de experimentación.

Inoculamos una suspensión bacteriana determinada de Streptococcus viridans, por vía intraperitoneal, y al cabo de un tiempo y con unas condiciones determinadas, inyectamos soluciones del agente inductor.

La observación de los síntomas y la recogida de muestras, con lo consiguiente identificación de los microorganismos -- del interior de los animales, nos permitió ver las modificaciones aparecidas en estos estreptococos.

Microorganismos.

Streptococcus viridans 38487 y 38566 de nuestra colección.

Ratones.

Albinos de peso aproximado 20 g. con los que formamos 5 lotes de 5 ratones cada uno.

El formar estos lotes de ratones fue para reunir en el estudio 2 factores:

1º. La observación de las alteraciones producidas por distintas unidades de penicilina sobre los microorganismos ino-

culados, en relación con los diversos tiempos de sacrificio - de los animales.

2º. La observación de las transformaciones ocurridas en - la anatomía y biología de los ratones.

Distribuimos los lotes de la forma siguiente:

Lote 1 control. Lotes 2, 3, 4 y 5 para la inoculación de la suspensión bacteriana e inyección de 1000UI/c.c.; 2.000UI/c.c.; 6000UI/c.c.; y 12000UI/c.c. de penicilina.

Medios.

Líquidos: Tood-Hewitt y los de las pruebas de identificación.

Sólidos: Agar, 1,5; Agar 0,8 %; Agar PPLO y los de identificación ya descritos en el capítulo de materiales y métodos.

Diluciones de penicilina.

1000UI/c.c.; 2000UI/c.c.; 6000UI/c.c. y 12000UI/c.c. de penicilina G sódica.

Técnica.

Inoculación de 1 c.c. de la suspensión bacteriana por vía intraperitoneal, previa anestesia por inhalación con éter de los ratones. Se inoculó una suspensión de Streptococcus viridans de un cultivo de 24 horas en medio Tood-Hewitt, que presentaba una densidad óptica de 0,194 a 580 mμ de longitud de onda. (Bacterias en fase de crecimiento).

Al cabo de 15 minutos se les inyectó por vía subcutánea 1 c.c. de solución de penicilina G sódica con las siguientes - unidades: 1000; 2000; 6000; y 12000 U/c.c.

Después de las inyecciones y al cabo de 3, 6 y 24 horas - se sacrificó un ratón de cada lote, realizándose las pruebas siguientes:

- a) Anotación de los síntomas.
- b) Sacrificio de los animales con disección y observación anatómica.
- c) Recogida de líquido peritoneal con pipeta Pasteur y de sangre por punción cardíaca, efectuando siembras en placas - por el sistema de inundación en el caso de los líquidos peri-toneales y por goteo sobre la superficie de la placa con la sangre, para en ambos casos, extender por movimientos circulares sobre la superficie de la placa de cultivo.
- d) Tinciones de extensiones de sangre, líquido peritoneal, exudados y colonias.
- e) Toma de muestras de glándulas y tejidos alterados.
- f) Pruebas de identificación de los microorganismos.

Los medios de cultivo en placas son los utilizadas para - crecimiento e identificación de micoplasmas, forma L y Strep-
tococcus viridans formando dos series para cada caso, con au-
sencia o adición de 6.666U/c.c. de penicilina para comprobar
en estas siembras los medios más idóneos de crecimiento y --

las posibilidades de reversión.

Al encontrarnos en las autopsias mucosidades adheridas a los cápsulos suprarrenales y serosidades en las asas intestinales, tomamos una porción con pinza estéril y frotamos sobre la superficie de un porta, extendemos y dejamos secar a temperatura ambiente, para pasar a teñir.

Con otra porción sembramos mediante frotación sobre la superficie de las placas.

Cultivamos todas estas siembras a 37°C en atmósfera CO₂ - creada por el sistema Gaspak.

Las resiembras se efectuaron por el sistema "cuadradito", según método Crawford y Kraybill (1967).

El trabajo fue desdoblado en dos partes:

1^{er} ensayo: Inducción con una dosis de antibiótico.

Al cabo de 15 minutos de la inoculación de la suspensión bacteriana, inyectamos por vía subcutánea 1 c.c. de las diluciones de 1000, 2000, 6000 y 12000UI/c.c. de penicilina G sódica, a los 5 ratones de cada lote.

A las 3, 6 y 24 horas de estas inyecciones y previa observación de los síntomas, se sacrificó un ratón de cada lote - en cada tiempo ya indicado.

Realizamos con cada uno de los animales las pruebas ya indicadas.

2^o ensayo: Inducción con dos dosis de antibiótico.

Tomando un ratón de cada lote de los que ya estaban inocu

lados, inyectamos de nuevo por vía subcutánea, después de 10 horas de la primera inyección de antibiótico, con las unidades de penicilina que corresponden en cada caso.

A las 3 y 24 horas de esta inyección sacrificamos nuevamente un ratón de cada lote.

Efectuamos las mismas pruebas que en el 1^{er} ensayo.

3. ESTUDIOS PARA LA COMPARACIÓN ENTRE MICOPLASMAS Y LA FORMA L INDUCIDA.

Establecidas las condiciones de crecimiento e identificación de micoplasmas y de la forma L inducida, tratamos de -- compararlos en este capítulo; es decir, someterles a crecimientos en idénticas condiciones de cultivo, y mediante variaciones cualitativas y cuantitativas de los medios nutricionales destacar las variaciones acaecidas en cada uno de ellos.

Separamos el trabajo en varios ensayos:

1) Pruebas de crecimiento comparativas:

- A) Influencia de la consistencia del agar.
- B) Influencia de las distintas unidades de penicilina.
- C) Influencia de los medios enriquecidos.

2) Pruebas de identificación comparativas:

- A) Filtración.
- B) Sensibilidad a la digitonina.
- C) Patogenia y persistencia.

1) Pruebas de crecimiento comparativas:

Cuando realizamos los ensayos de inducción de forma L y los cultivos de micoplasmas, ya indicamos la existencia de -- una relación entre las variaciones de los componentes de los medios de cultivo y las modificaciones morfológicas y biológicas de los microorganismos en ellos cultivados. Por ello - en este capítulo relacionamos cada factor de influencia con la modificación en los microorganismos, sus semejanzas y diferencias.

Características generales.

Cultivos en medio líquido, especificados mediante pases sucesivos para comprobar crecimiento y usar cultivos jóvenes.

Cultivo sobre agar en el medio bifásico. 4 pases de 3 - - días cada uno, total 12 días de incubación.

Cultivos en placas, observación de crecimiento, pruebas - identificación de los microorganismos cada 4 días.

Atmósfera CO₂ (Gaspak), humedad y temperatura a 37°C pre -
cintando las placas para evitar contaminación.

Resiembras método Crawford y Kraybill (1967).

Los factores que se estudian son:

a) Influencia de la consistencia del agar.

Después de comprobar los crecimientos de nuestras muestras en sus correspondientes medios líquidos, sembramos cada microorganismo en diversos medios sólidos de distinta consistencia de agar manteniendo constantes los otros factores de crecimiento y observamos las modificaciones morfológicas, -- tintoriales y bioquímicas.

Microorganismos: Micoplasmas de nuestra colección, forma L inducida.

Streptococcus viridans 38487 y 38566.

Medios.

Líquidos: los específicos de crecimiento e identificación de cada microorganismo.

Sólidos: Agar PPLO agar 1,5 %, agar 0,8 %; y los Medios - de identificación y conservación, y estos mismos con adición de 6666U/c.c. de penicilina G sódica.

Técnica.

El número de placas sembradas para cada microorganismo y cada medio fue 6: 2 utilizadas para resiembras; 2 para tinciones; 2 para permanecer un número indeterminado de días en incubación hasta envejecimiento total.

Las placas se sembraron por inundación (inóculo 1 c.c.) y

retirado del sobrenadante al cabo de 15 minutos.

b) Influencia de las distintas unidades de penicilina.

Proyectamos este ensayo para observar la acción de la penicilina G sódica sobre nuestros microorganismos abarcando este efecto sobre cultivos en medios líquidos y sólidos, comprobando con gradientes de este antibiótico; las unidades -- más idóneas a utilizar en sus cultivos y las que son capaces de dar formas alteradas de su morfología como sistemas de -- comparación.

La utilización del agar Columbia se debe al intento de -- comprobar la acción de distintas unidades de penicilina en -- crecimientos sobre medios enriquecidos diferentes a los específicos de crecimiento (agar PPLO).

Se sembraron los microorganismos en medios con distintos gradientes de penicilina adicionados tanto a los medios líquidos como sólidos, manteniendo constantes los demás factores.

Las unidades de penicilina G sódica utilizadas fueron: -- 4000UI/c.c.; 6000UI/c.c. y 16000UI/c.c.

Medios.

Líquidos: los específicos de crecimiento e identificación.

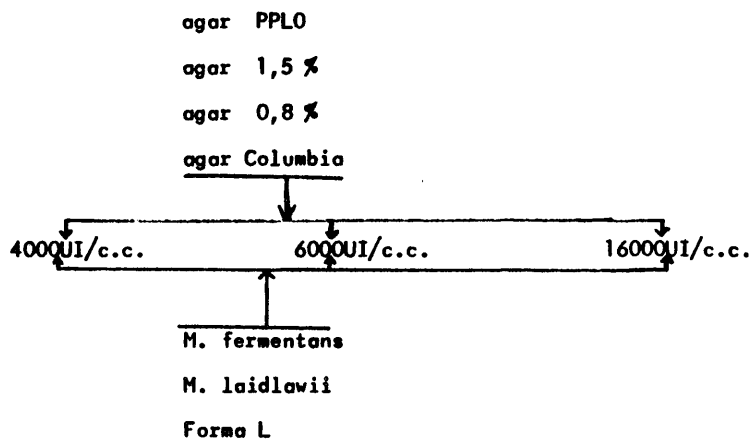
Sólidos: agar PPLO; agar 1,5 %; agar 0,8 %; agar Columbia y los medios de identificación.

Técnica.

Las fotos se hicieron con siembras de cultivos jóvenes de 4 pares en medio líquido específico.

Cultivos en medios líquidos y siembras en placas ya descritos.

(FOTOS)



c) Influencia de medios enriquecidos.

Consideramos medios enriquecidos el medio agar PPL0, pues lleva adición de líquido ascítico, y en medios adicionados - con suero de caballo, agar Columbia y Medio Miñis salivarius. Medio para levanos.

Medios.

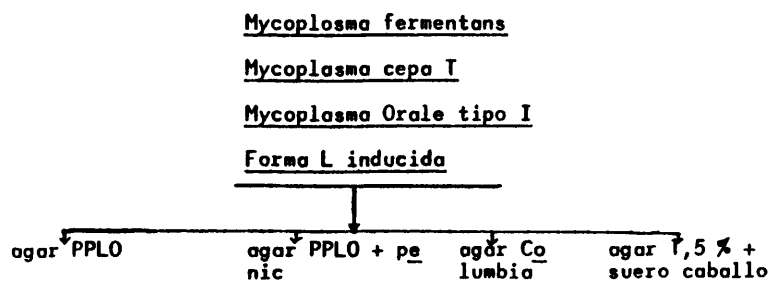
Líquidos: los específicos de crecimiento.

Sólidos: agar PPLO; agar 1,5 % + suero caballa al 10 %; --
agar Columbia.

Técnicas.

Los ya descritas.

(FOTOS)



2) Pruebas de identificación comporativas.

Generalizamos técnicas de diversos autores encontradas en la bibliografía, haciéndolas utilizables a todas nuestras -- muestras, dando así un carácter de comparación a los resulta-- dos encontrados, bien por semejanza a par diferenciación. .

Las pruebas realizadas fueron:

a) Filtración.

Introducción.

La filtración es una propiedad utilizada para el aisla- - miento o separación de bacterias de micoplasmas en muestras_ " patológicas, como ya se describió en el capítulo de Métodos.

Nosotros utilizamos este método aquí para, mediante el -- uso de filtros de tamaño de poro definido, poder comprobar -- si nuestros microorganismos en estudio, es decir, si mico- -- plasmas, forma L inducida y Streptococcus viridans son capaces o no de atravesar estos poros y así tener un método comparativo.

La utilización de filtros de membrana para métodos bacteriológicos data de 1918 cuando ya eran utilizados por Zsigmondy y Bachmann y más tarde Hajna y Damon (1954) que llegan a determinar bacterias coliformes y microorganismos de tipo paratífico en aguas consideradas potables.

Asimismo el método nos sirve para reconocimiento de forma L, pues ya Klieneberger-Nobel (1949), Tulasne (1953) y Haudroy (1954), afirmaban que las formas L atraviesan filtros -- que detienen a las bacterias normales de origen.

Materiales.

Equipos de filtración descritos en el capítulo de Materiales.

El trabajo fue desdoblado en los siguientes ensayos:

1º. Filtración al vacío a través de filtros Millipore colocados en embudo y matraz.

Volumen filtrado: 100 c.c. de cada muestra.

2º. Filtración a través de filtros Millipore colocados en jeringa estéril de cristal, según experiencias de Wyrick y --

col. (1971).

Volumen filtrada: 2 c.c. de cada muestra.

3º. Filtración al vacío a través de filtros EKA.

Volumen filtrado: 10 c.c. de cada muestra.

Preparación de los filtros.

Los aparatos de filtración provistos de los determinados_ filtros se envuelven en papel fuerte y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 30 minutos (conviene compensar la -- presión por enfriamiento lento, pues se puede romper el filtra- tra).

El aparato ya estéril, se conecta mediante tapón de goma_ perforado a un frasco de succión, conectado a su vez, median- te un tubo adecuado para vacío con una trompa o bomba de va- cío.

En el caso de filtración a través de jeringas, los filtros se adquieren ya estériles de fábrica y solo es colocarles -- con pinzas en ambiente estéril en la jeringa.

Antes de la utilización los filtros fueron lavados con -- agua bidestilada estéril, pasándola a su través para arras-- trar las posibles partículas que pudieran interferir el pro- ceso. Esto fue especialmente efectuado en el caso de los fil- tros EKA, pues su composición es más compleja pasando 20-40_ c.c. de agua bidestilada estéril.

Técnica.

El crecimiento de los microorganismos en estudio se realizó en sus correspondientes medios de cultivo, efectuándose las lecturas de sus densidades ópticas en espectrocolorímetro, o una longitud de onda de 580 mμ utilizando agua destilada como patrón de referencia.

Al finalizar los filtrados por cualquiera de las técnicas utilizadas, cada filtro fue recogido con pinzas estériles y trasladado a la superficie de las placas de cultivo, quedando la superficie de filtración íntimamente pegada a la superficie de la placa. Las placas utilizadas eran de agar PPL0 (por ser el medio más enriquecido). Los filtros fueron retirados a los 3 días del contacto con la placa.

Los líquidos filtrados fueron nuevamente leídos en el espectrocolorímetro, y sembrados según la técnica habitual de trabajo.

Se cultivaron a 37°C en ambiente CO₂ y desde los 48 horas hasta los 15 días fueron observados diariamente los crecimientos a través del microscopio estereoscópico.

Las pruebas de identificación se realizaron con cada líquido de cultivo antes y después de la filtración.

Las tinciones fueron observadas y anotadas las modificaciones.

b) Sensibilidad a la digitonina.

El trabajo consiste en someter a la acción de disoluciones de digitonina muestras de micoplasmas, forma L inducida y -- Streptococcus viridans para comparar la resistencia o sensibilidad de cada uno de estos microorganismos.

Nos basamos en las experiencias de Razin y Argaman (1963) que someten cultivos de micoplasmas, esferoplastos, forma L_ y eritrocitos humanos a la acción de las diferentes concentraciones de digitonina.

Medios.

Líquidos: los específicos Hayflick (sin adición de líquido ascítico) de crecimiento a los que se les añadió un 20 % de sacarosa como recomiendan estos autores

Disoluciones de digitonina:

Se disolvió 2,4 mg. de digitonina (Merck) en 10 c.c. de - agua destilada estéril; de esta dilución madre, formamos diluciones de 7 ug; 30 ug; 60 ug; 120 ug; y 240 ug de digitonina.

Técnica.

Realizamos las lecturas de crecimiento de cada uno de los microorganismos en sus medios líquidos específicos de crecimiento, adicionados de sacarosa, utilizando el espectrofotómetro a 580 nm de longitud de onda y se tomó como patrón -

agua destilado para evitar error por cambio de color (pH).

Los cultivos se realizaron en matraces Monod, para que directamente, por su tubuladura lateral, se pudieran efectuar las lecturas rápidamente sin posibilidad de contaminación y seguidamente efectuamos la siembra de estos líquidos en placas.

Sobre estos cultivos líquidos añadimos las diferentes diluciones de digitonina. Dejamos en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos, leímos nuevamente los líquidos en espectrocolorímetro y así comprobamos las variaciones, trazando sus curvas.

Sembramos nuevamente placas por el método de inundación y de esta manera por comparación de los crecimientos antes y después de la adición de las diluciones de digitonina, comprobamos en los crecimientos en placas la posibilidad de lisis o resistencia a su acción.

Se cultivaron estas placas a 37°C en anaerobiosis.

Se hicieron tinciones de los cultivos líquidos antes y después de la adición de la digitonina y de las colonias crecidas en las diferentes placas sembradas con dichos cultivos.

Para cada microorganismo se realizaron las pruebas de identificación antes y después de la acción de la digitonina.

c) Patogenia y persistencia.

Introducción.

En este trabajo estudiamos la posibilidad de patogenia y persistencia en ratones, de determinados micoplasmas humanos, Streptococcus viridans y forma L inducida en nuestro laboratorio, mediante inoculación intraperitoneal en ratón, de sus suspensiones de los microorganismos citados.

Para ello dividimos la experiencia en 2 ensayos:

1º. Observación de síntomas patógenos en el animal inoculado.

2º. Comprobación de la persistencia mediante identificación de estos microorganismos, antes y después de la inoculación, observando las variaciones.

La comprobación de la persistencia se efectuó mediante -- las técnicas específicas de identificación de cada microorganismo en siembras de las suspensiones antes de las inoculaciones y en la recogida de sangre, líquidos peritoneales y -- serosidades de los animales sacrificados.

Mediante fotografías de la observación directa o de las -- tinciones, se forma una colección de comparación.

Medios.

Líquidos: los específicos de crecimiento e identificación.

Sólidos: específicos de crecimiento e identificación.

Técnica,

Formamos 5 lotes de 10 rotones cada uno distribuyéndolos - de la forma siguiente:

Lote 1 control.

Lote 2 para inoculación de suspensión de Mycoplasma fermentans.

Lote 3 para inoculación de suspensión de Mycoplasma laidlawii.

Lote 4 para inoculación de suspensión de Streptococcus viridans.

Lote 5 para inoculación de suspensión de forma L inducida laboratorio.

La inoculación se realizó con cultivos líquidos de 24 horas, tomando 0,5 c.c. de inóculo para cada caso. Inoculación intraperitoneal previa anestesia con éter de los rotones.

Se sacrificaron los rotones tomando una de cada lote a lo largo de 10 días, efectuándose los siguientes trabajos:

a) Disección y observación de la anatomía.

b) Siembra de la sangre obtenida por punción en corazón.- Siembra de los líquidos peritoneales recogidos con pipeta -- Pasteur y de los serosidades tomados con pinza estéril.

Las siembras se realizaron, para la sangre y los líquidos peritoneales, por goteo sobre la superficie de la placa, extensión con movimientos de rotación y retirada del sobrena--

dante al cabo de 15 minutos. Para las serosidades se sembraron tomando las adherencias con pinza estéril y por frotación sobre la superficie de las placas.

Cultivo a 37°C en anaerobiosis. Resiembras por el método de Crawford y Kraybill (1967).

- c) Tinciones de sangre, líquidos peritoneales y exudados.
- d) Pruebas de identificación de los microorganismos.

152 . . .

V. RESULTADOS.

MICOPLASMAS

A) Los resultados están incluidos en el apartado C).

B) Envejecimiento.

Las variaciones de pH para cada micoplasma en su cultivo_ en medio líquido, están íntimamente relacionados con la presencia de formas morfológicamente típicas.

Encontramos que para una misma serie las extensiones de - los cultivos de los medios líquidos, se van modificando a lo largo de sus días de incubación: Tinciones de extensiones de cultivos del tubo 1 a los 4 días de incubación, muestran formas filamentosas ténues con cocos diminutos en su interior; - tinciones de estos mismos líquidos (tomando igualmente muestras del tubo 1) a los 10 días de incubación presentan agregados con cocos en su interior y si las extensiones se hacen con muestras de este mismo tubo 1 al cabo de 15 días de su - incubación, observamos un aumento del número de masas de - - agregados con formas cocoides en su interior.

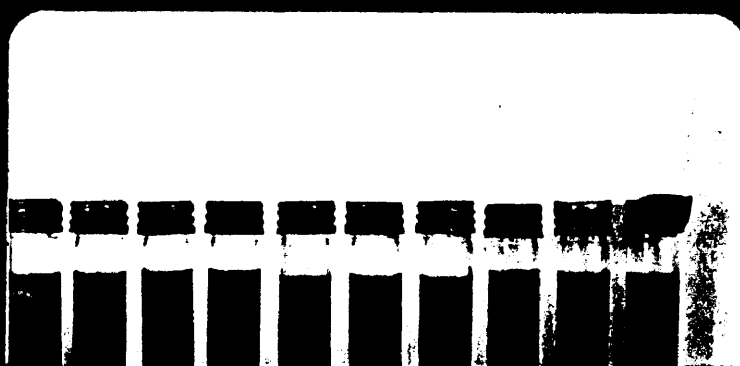
Es de destacar que cuando dejamos secar varias horas a -- temperatura ambiente las extensiones efectuadas con los lí-- quidos de crecimiento y teñimos con los distintos colorantes, la observación es más perfecta que si las secamos a calor -- suave, sobre todo cuando utilizamos el método Gram.

Existe modificación entre las series de cultivos en medio líquido con adición o ausencia de penicilina; podemos decir_ que estos microorganismos cultivados en medios con penicili-

VARIACION DE pH DE LAS SERIES.

Acidificacion.

Alcalinizacion.



na presentan dificultad para tomar los colorantes (sobre todo el Gram) presentando menor tamaño y el número de microorganismos está disminuido con respecto a aquellos cultivos carentes de penicilino.

Las variaciones morfológicas a través de los días de incubación en medios líquidos se presentan más claramente para los cultivos de Mycoplasma fermentans y Mycoplasma ladlowii, destacando también que en los cultivos de Mycoplasma cepa I a los 10 días ya se observan formas muy traceadas.

Los pruebas de identificación se mantienen durante todo el proceso de envejecimiento, tanto en los cultivos en medio líquido como en las placas.

Los cultivos en placas presentan igualmente diferencias de número de microorganismos y de tamaño de las colonias, según que contengan o no penicilina, pues comprobamos que la penicilina reduce el número de microorganismos y entonces los que se observan presentan mayor tamaño y una morfología más marcada.

Podemos decir en general:

Cultivos en placas de agar PPL0 presentan formas con morfología típica de "huevo frito", es un medio de gran duración y fácil manejo.

Cultivos en agar 0,8 %, las colonias adquieren mayor tamaño, pero este medio se agota antes, y a los 10-15 días está desecado. Es un medio de difícil manejo para tinciones y re-

siembras.

Agor 1,5 % muestra crecimiento de formas típicas, los centros de las colonias presentan granulaciones más profundas y destacables; a los 10-15 días también está muy deteriorado.

El mycoplasma fermentans es el que presenta durante más días la forma típica de la colonia, para poco a poco perder las granulaciones interiores a trozos, por formación en su crecimiento en profundidad la forma de cráter. Pasando por las siguientes fases: crecimiento en forma típica visible a los 5 días de su siembra. A los 15 días presencia de granulaciones abundantes con zona central muy marcada, a los 20 días las granulaciones empiezan a desprenderse, quedando solo la zona central más oscura; a los 25 días observamos pérdida de trozos de su constitución. (FOTOS).

Las granulaciones continúan haciéndose débiles a través de las incubaciones hasta quedar totalmente disgregadas en el agar, aproximadamente a los 30 días.

El Mycoplasma pneumoniae disgrega sus gránulos de una manera ténue, hasta quedar muy difuminados sobre la superficie del agar. Siendo su envejecimiento más rápido (10 días). La prueba de Beta hemolisis en sangre de caballo (las demás presentan alfa hemolisis) es interesante para diferenciarle, -- pues se presenta aunque el crecimiento sea de gránulos ténues.

Mycoplasma cepa I presenta poca variación en su envejecimiento, tanto en su variación de tamaño como en la aparición

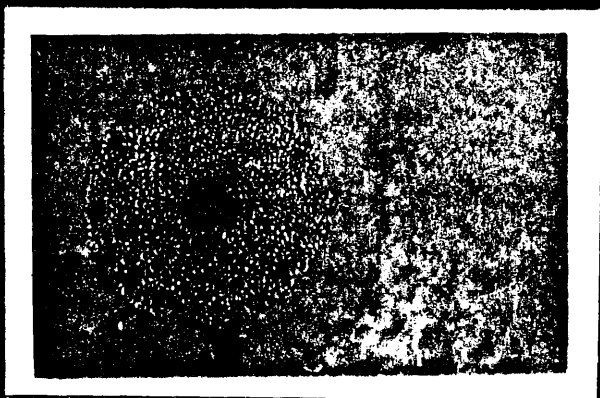
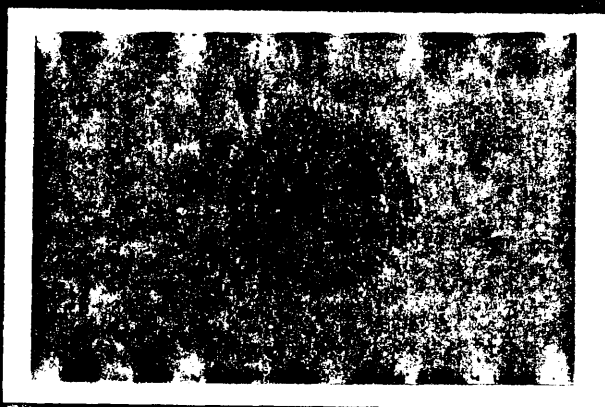
158

MYCOPLASMA FERMENTANS.

Morfologia de una colonia procedente de un cultivo de 15 dias en
placa de agar PPLO con penicilina

Colonia a los 20 dias de incubacion.

Colonia a los 25 dias de incubacion.



de granulaciones. Es muy sensible a los cambios de pH del medio líquido de tal manera que siembras de cultivos con modificación de pH ácido muestran en las placas crecimientos muy deteriorados o incluso total ausencia de colonias en las placas.

Los micoplasmas presentan la posibilidad de cultivo en el medio denominado Medio mitis salivarius formando unas colonias típicas azuladas con aro en el centro, de envejecimiento lento.

Es también interesante su cultivo en el medio de levanos dando lugar a la formación de unos mucosos semejantes a los que forma el Streptococcus viridans en este medio.

Tinción con tiónina de las extensiones de levanos formados por los micoplasmas presentan buena visibilidad de estos microorganismos entre esta sustancia, presentando unos filamentos con granulaciones muy marcadas en su interior.

C) Variaciones morfológicas de micoplasmas.

1^{er} caso.

Crecimiento en medios sin penicilina.

Medio líquido.

Las variaciones de pH de las series se presentan de muy diversa manera para cada microorganismo:

Para el Mycoplasma laidlawii los cambios de pH aparecen -

en el tubo 1 de la segunda serie, es decir, en el día 6 de la siembra inicial y a los 8 días de esta siembra toda la serie presenta crecimiento.

Resiembras posteriores presentan crecimiento a los 6-8 días de la siembra.

Para el Mycoplasma fermentans el crecimiento (ligeramente opaco), se observa el día 3 de la segunda serie, es decir, el día 8 de la siembra inicial.

El Mycoplasma pneumoniae presenta crecimiento a los 5 días de la tercera serie, es decir, el día 15 del cultivo inicial. Crecimientos posteriores se presentan cada 6-8 días de resiembra.

El Mycoplasma salivarius presenta crecimiento el día 3 de la 3ª serie, es decir, el día 13 de la siembra inicial. En siembras posteriores el crecimiento se manifiesta a los 6-8 días de la siembra.

El Mycoplasma orale tipo I muestra crecimiento en el día 2 de la 3ª serie, es decir, el día 12 de la 1ª siembra.

El Mycoplasma hominis tiene crecimiento el día 4 de la 3ª serie, es decir, el día 14 de la primera siembra.

Los Mycoplasmas cepa I crecen en el tubo 2 de la serie -- cuatro, es decir, tardaron bastantes más días. Crecimientos posteriores aparecieron a los 6-8 días de las siembras.

Tinciones:

En los líquidos de cultivo del tubo nº 1 de la primera se

rie observamos que toman difícilmente los colorantes Gram y Giemsa, apareciendo ramificaciones entre cuyas uniones se observan cocos muy pequeños.

La tinción Dienes para cortes de agar con colonias, nos permite observar formas semejantes a la morfología de forma L inducida cuando realizamos tinciones de colonias entre porta y cubre con este colorante.

Medio sólido.

En las placas sembradas con los líquidos específicos de cultivo sin adición de penicilina, observamos en algunos casos el crecimiento de formas de lagunas granulosas sobre toda la superficie de la placa.

Resiembras por el método Crawford y Kraybill (1967), de cortes de estas lagunas crecidas en el agar, nos muestran cómo vuelven a crecer con las mismas características, pero nunca toman su forma típica de "huevo frito". Manteniendo en todos estos ensayos, las pruebas de identificación para cada micoplasma.

Existe una gran diferencia morfológica de cada microorganismo, según el método de tinción utilizado, por lo que presentamos una colección de fotos para su comparación.

En general podemos decir que al cabo de 10 días de cultivo en medio CO₂ y a 37°C, observamos:

M. fermentans- en las diferentes placas se observan for--

162

MYCOPLASMA FERMENTANS.

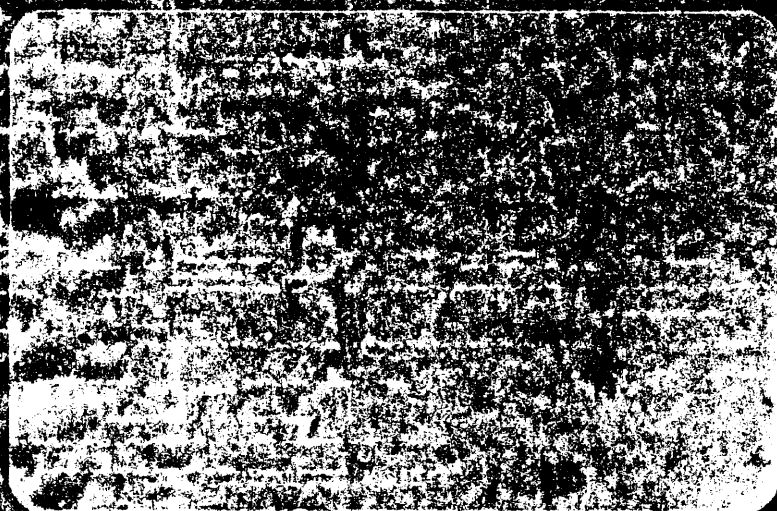
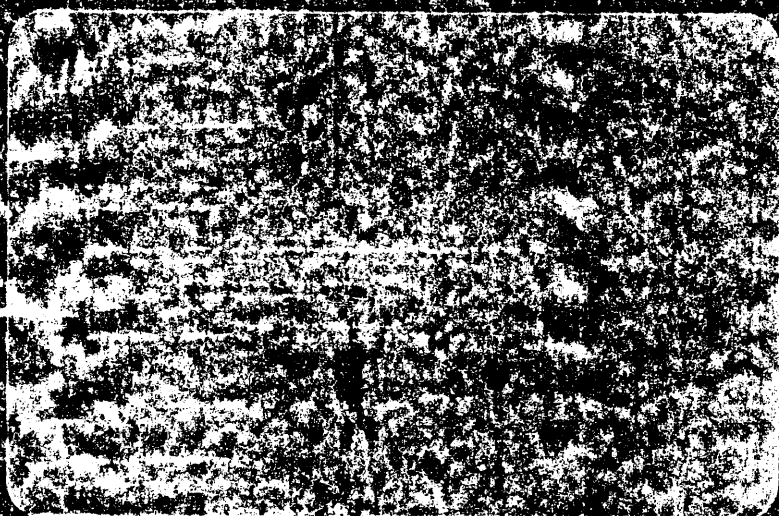
Tincion Gram

Cultivo de 6 dias

Tincion Gramsa

Cultivo de 6 dias

"



163

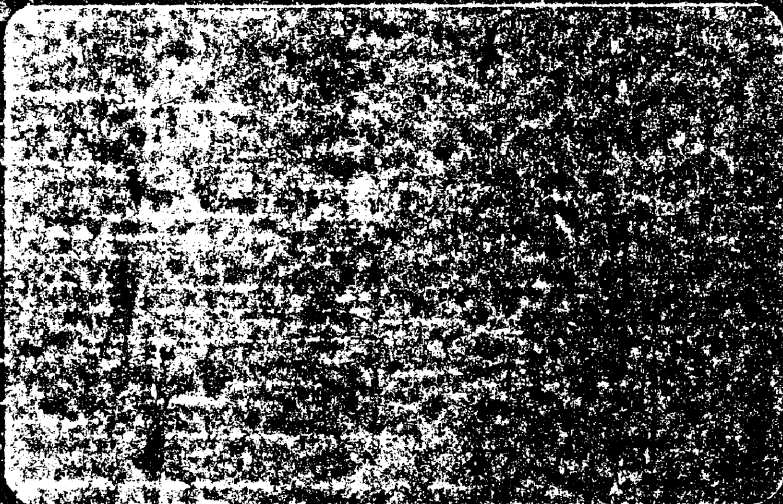
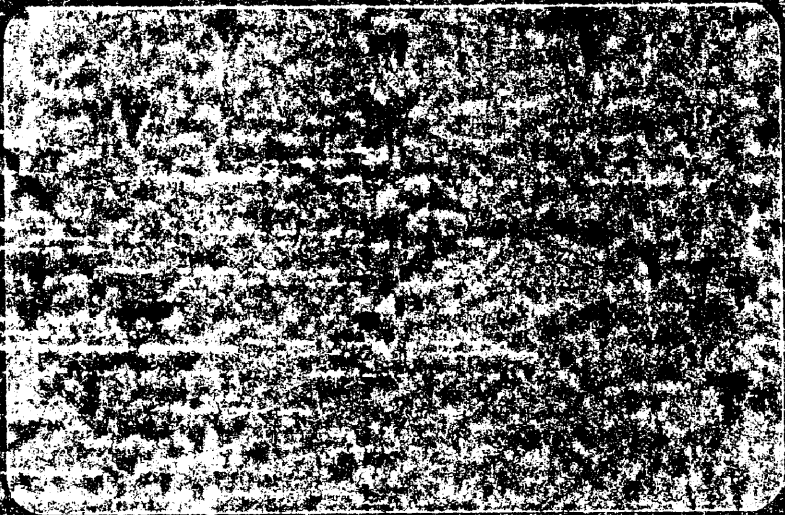
MYCOPLASMA LAIDLAWII.

Tincion Gram

Cultivo de 6 dias

Tincion Gramsa

Cultivo de 6 dias



164

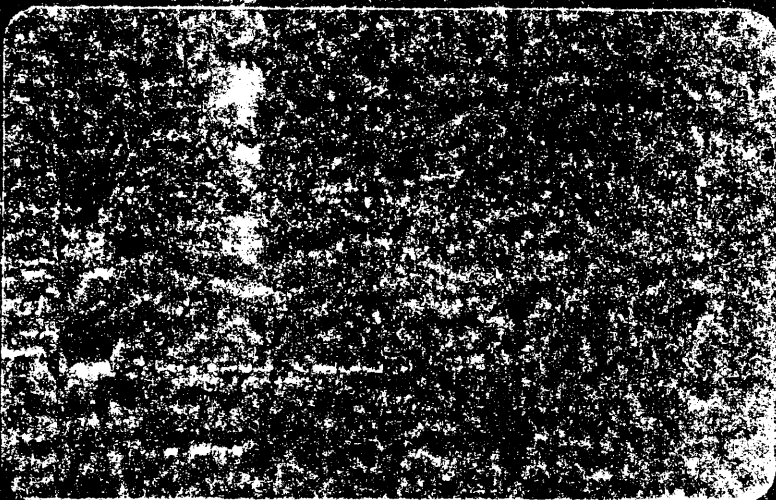
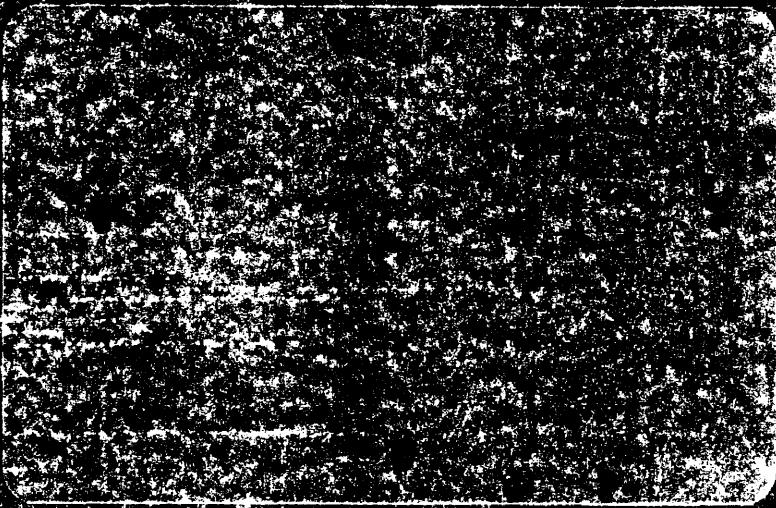
MYCOPLASMA HOMINIS

Tincion Gram

Cultivo de 6 dias

Tincion Giemsa

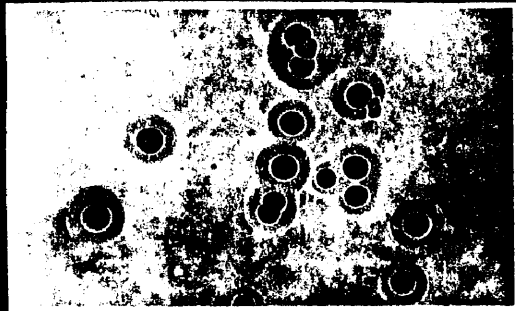
Cultivo de 6 dias



165

TINCION DIENES -COLONIAS.

Colonias de Mycoplasma fermentans.



mas granulosas sobre la superficie (gran crecimiento) en la_ que destacan algunos puntos redondeados.

M. laidlawii- formas redondeadas granulosas de tamaño medio.

M. orale- Agar PPLO- Formas irregulares grandes muy ténues con granulaciones en su interior.

Agar PPLO con penicilina- Formas irregulares de menos tamaño, muy ténues, con granulaciones en su interior. (FOTO).

Agar 1,5 %- Formas irregulares pequeñas con granulaciones.

Agar 0,8 %- Formas irregulares medianas granulosas ténues.

Agar 0,8 % con penicilina- formas irregulares tamaño medio. (FOTOS).

M. hominis- Agar PPLO- lagunas granulosas sobre toda la superficie.

Agar PPLO con penicilina- Masas irregulares granulosas tamaño medio, y formas puntiformes sobre la superficie.(FOTOS).

2º Caso.

Crecimiento en medios con penicilina.

Medio líquido.

Para los Mycoplasma fermentans y Mycoplasma laidlawii aparecen los cambios de pH al 5º día en la primera serie.

En Mycoplasma pneumoniae el crecimiento se muestra a los 5 días en la segunda serie. Es decir, el 10º día de cultivo inicial, y en el 4º día de la segunda serie hay viraje para_

MYCOPLASMA ORALE tipo 1

167

Cultivos de 10 días

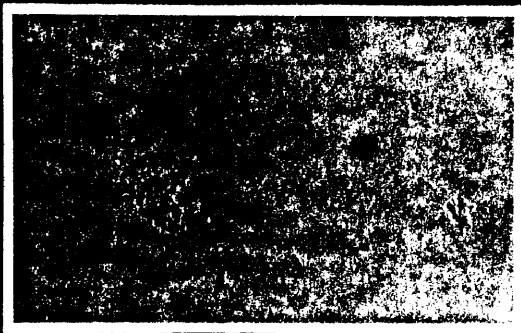
Medio agar 1,5%.

Medio agar 0,8%.

Medio agar 0,8% con penicilina.

Medio agar PPLO.

Medio agar PPLO con penicilina.



168

MYCOPLASMA HOMINIS

Cultivo de 10 días en placa con medio agar PPLO

Cultivo de 10 días en placa de agar 1,5% con penicilina



el Mycoplasma hominis.

Para el resto de los micoplasmas podemos decir que el crecimiento se observa en la segunda serie al cabo de 5-6 días de cultivo.

Tinciones:

Toman con más intensidad los colorantes en especial la coloración de Gram, presentando largos filamentos que encierran cocos pequeños y formas cocoides en sus ramificaciones y entrecruzamientos.

Medio sólido.

Variaciones notables se presentan en la morfología de las colonias. Las muestras han permanecido conservadas 2 años en nevera a -20°C (como los ensayos previos muestran resultados iguales para las conservadas en medio Loeffler como Hayflick, formamos los trabajos con las que habían estado en medios -- Hayflick). Las siembras en placas se realizan después de dar a cada micoplasma 3 resiembras en sus medios Hayflick específicos, y comprobar sus pruebas de identificación.

En los crecimientos de Mycoplasma fermentans observamos crecimiento de formas redondeadas agrupadas en el interior de un oro grande que las delimita. A lo largo de los días de incubación van apareciendo granulaciones en el área que las envuelve, comienza su desintegración, por el oro que las envuelve, marcándose más intensamente las granulaciones inte--

riores hasta disgregación total.

En las resiembras crecen estas formas, no llegando a tomar forma individual de "huevo frito". Estas formas presentan una forma más visible en las siembras sobre placa de agar PPL0. (FOTOS).

Tinciones de Dienes muestran estas formas perfectamente delimitadas cada colonia en el interior de esa agregación.

En las siembras de Mycoplasma pneumoniae observamos formas redondeadas agrupadas, de tamaño grande. Su crecimiento es hacia el interior del agar y a través de los días de incubación se va formando un reborde exterior que dará lugar a doble reborde, reuniendo así esas formas redondeadas en una masa. (FOTOS).

Resiembras dan lugar a esta misma morfología. En la tinción Dienes observamos los componentes de esa agregación. El medio más idóneo es el agar PPL0 con penicilina.

El Mycoplasma salivarius en cultivos en agar 1,5 % es donde únicamente presenta formas redondeadas, en las que a lo largo de los días de incubación, aparecen puntos centrales que cada vez van marcando más la forma central. (FOTO).

En cultivos sobre agar 1,5 %, es donde únicamente aparecen para el Mycoplasma cepa I formas redondeadas con punto central, presentando granulaciones en su interior y la superficie de la placa está cubierta de lagunas granulosas de gran crecimiento en superficie. (FOTO).

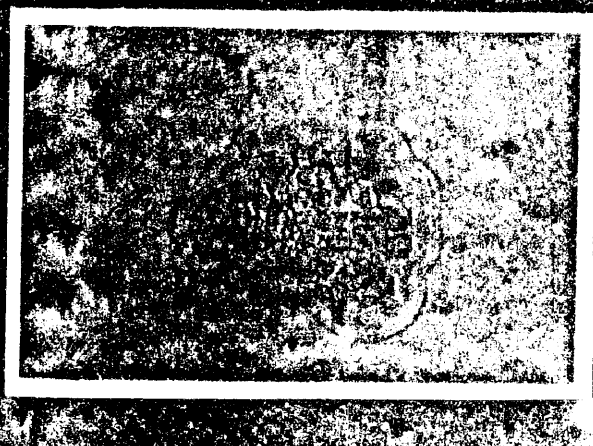
MYCOPLASMA FERMENTANS.

171

Morfología de una colonia procedente de un cultivo de 10 días
en placa de agar PPLO con penicilina.

Colonia a los 15 días de incubación.

Colonia a los 20 días.

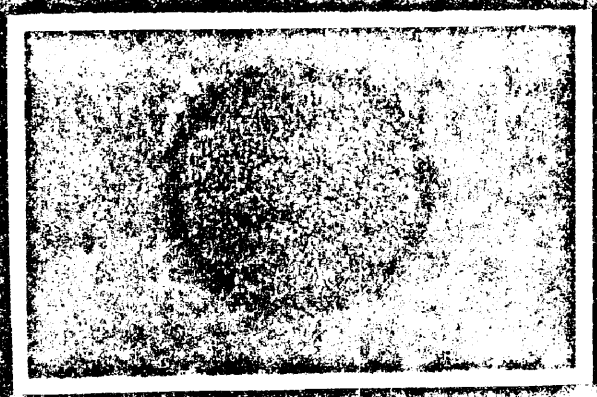
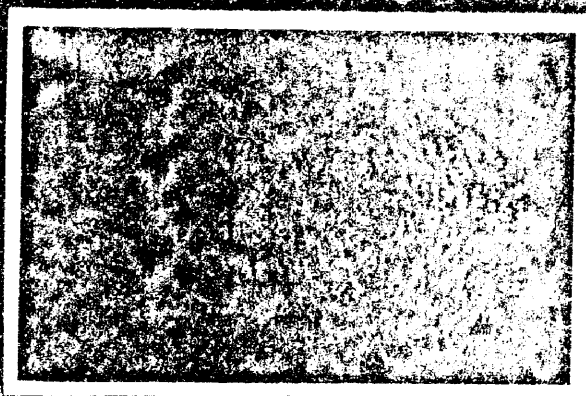


172

MYCOPLASMA PNEUMONIAE.

Morfologia de una colonia procedente de un cultivo de 10 dias
en placa de agar PPLO con penicilina.

Colonia a los 15 dias de incubacion.



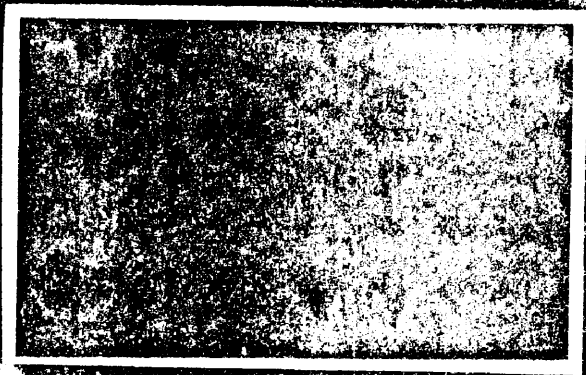
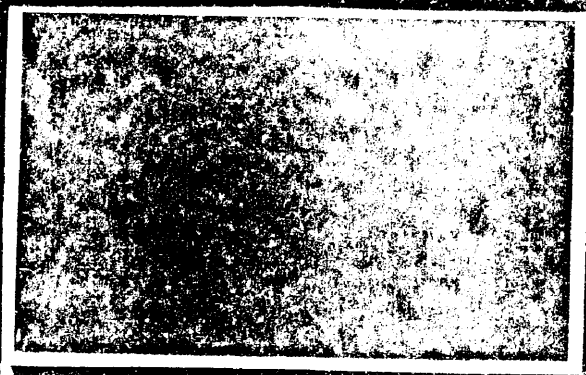
/73

MYCOPLASMA SALIVARIUS.

Colonia procedente de un cultivo de 10 dias en placa de agar 1,5%.

MYCOPLASMA CEPA T.

Colonia procedente de un cultivo de 12 dias en placa de agar 1,5%.



El Mycoplasma hominis es el que varío totalmente al ser - cultivado en medios con ausencia o presencia de penicilina, - como podemos observar al comparar las fotos. La presencia de formas típicas de "huevo frito" de gran tamaño en cultivos - de medio líquido con penicilina y posterior resiembra a me-- dio de agar 0,8 % con penicilina, con observación a través - de los días de incubación, nos muestra al cabo de 19 -- días de cultivo (evitando desecaciones de las placas) varia-- ción morfológica y envejecimiento típico, hasta acabar en -- disgregación total por pérdida de las granulaciones, a mane-- ra de estrellas granulosas.

Resiembras posteriores nos dan crecimiento de formas idénticas a las primitivas.

Las pruebas de identificación se mantienen en todos los - ensayos de este 2º caso.

Resiembras de trozos de formación de lagunas granulosas - no conducen en ningún caso a crecimientos de formas típicas - de micoplasmas.

D) Disgregación.

Cultivos jóvenes de micoplasmas en medios líquidos modifi-- can su morfología al ser sometidos a la acción de agua desti-- lada, soluciones de cloruro sódico (0,9 %); (2 %), y (8 %).

El agua destilada los modifica observando que quedan a ma-- nera de cocos diminutos de escaso crecimiento puntiforme so-

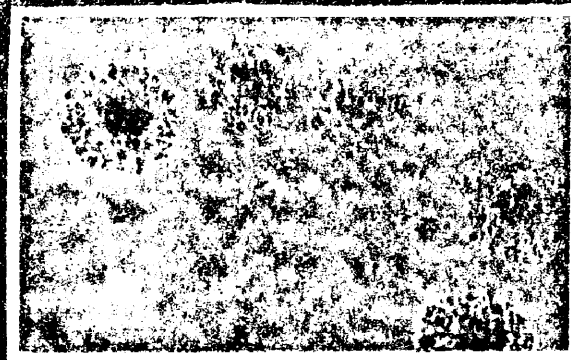
175

MYCOPLASMA HOMINIS.

Morfologia de una colonia procedente de un cultivo de 19 dias
en placa de agar 0,8% con penicilina.

Colonia a los 24 dias de incubacion.

"



bre la superficie del agar de las placas. A las 48 horas si se siembran los líquidos, no existe crecimiento.

Observaciones al microscopio de las tinciones de sus extensiones en estos líquidos, nos muestran cómo en ensayo con concentración alta de sal, ^{hay} formas más pequeñas y agrupadas - que toman difícilmente el colorante; mientras que las sometidas a la acción de concentraciones hipotónicas dan lugar a - partículas menos agrupadas y de tamaños ligeramente mayores, son formas algo aplanadas, como una masa central y de ella - parten como filamentos ténues vacíos en su interior.

En los cultivos en placas observamos que tanto las soluciones hipo e hipertónicas, destrozan estos microorganismos, solo crecen como "lagunas granulosas" muy ténues difíciles - de ver.

El efecto de la centrifugación da lugar a formación de masas que en las tinciones muestran agregados con formas cocoides en su interior. Resiembras en placas de estos líquidos - crecen en forma de lagunas granulosas sobre toda la superficie de las placas.

Las colonias deformadas por la acción del agua destilada o disoluciones de cloruro sódico, vuelven a su forma inicial al ser cultivadas en 2 resiembras en sus medios líquidos específicos.

Inducción "in vitro".

A) Inducción en medio sólido.

En los ensayos de inducción realizados sobre medios sólidos, bien agregando el agente inductor al medio, en un surco o en un disco obtenemos formas puntiformes muy difíciles de determinar en número y morfología.

Las formas de crecimiento puntiforme que ocupan toda la superficie de la placa las denominamos "lagunas granulosas", observando en su interior diminutas granulaciones, a veces algo refringentes, que apenas toman los colorantes, de tal manera que al ser resembrados en medios carentes del agente inductor vuelven a su forma de origen.

El agar de consistencia 0,8 % es de difícil utilización para colocación de disco o corte de surco, pues se trocea fácilmente.

B) Inducción en medio líquido.

En ensayos previos observamos que se presenta un crecimiento más abundante de formas ténues, cuando añadimos la penicilina a cultivos líquidos de Streptococcus viridans en su fase de crecimiento logarítmico, que al adicionar el agente inductor en sus primeras horas de cultivo.

El crecimiento es más rápido en aquellas series que proceden de resiembras de cultivos ya adaptados a la acción del agente inductor.

En las tinciones de las extensiones de los cultivos líquidos, observamos en las dos primeras series de resiembros (tanto la de 6666 como para la de 13222U/c.c. de penicilina) cocos puntiformes abundantes, que al ser sembrados en las placas, crecen en las "lagunas granulosas". Estas formas a través de las sucesivas resiembros en medio líquido se transforman en masas densas, de aspecto polimorfo con gran distorsión, presentando filamentos con ramificaciones en las que aparecen pequeños corpúsculos en su interior.

Cuando utilizamos medio líquido base Todd-Hewitt con 6666U/c.c. y 13.222U/c.c. de penicilina comprobamos que a partir de la resiembra 12, el crecimiento en placa es más rápido y la morfología se repite: formas irregulares ténues a veces granulosas en su interior.

En las series de medio Hayflick con 6666U/c.c. de 20 pases; en las de 13222U/c.c. con 12 pases, o en la de 15 pases en las primeras unidades y 15 en las segundas (en total 30 pases) obtenemos un crecimiento más rápido con formas redondeadas, marcadas formadas de cuerpos globosos ligeramente incrustados en el agar.

Siembras de líquidos de cultivos de 30 pases sobre placas de agar 1,5 %, agar 0,8 %, o medio gelatina sin agente inductor, conducen siempre al crecimiento de formas iguales a las descritas considerando ya esta morfología como fija o estable. Dicha forma presenta las propiedades de identificación del Streptococcus viridans exceptuando la alfa hemólisis.

C) Inducción en medios enriquecidos.

Cuando utilizamos para la inducción medios enriquecidos - observamos en las tinciones la formación de agregados filamentosos ténues, elásticos, que apenas toman los colorantes, presentando en su interior formas cocoides muy ténues.

Las siembras en placas muestran formas de morfología más marcada y su penetración en el agar es mayor. El pH de estos medios es interesante, pues siembras de líquidos que estén - ligeramente acidificados por el excesivo crecimiento, conducen al crecimiento de formas muy deformadas, incluso a no -- presencia de crecimiento.

La inducción en medio salino muestra un abundante crecimiento de colonias débiles, pero indicamos la dificultad de -- visión al aparecer granulaciones refringentes sobre la superficie de la placa, que pueden conducir a error.

D) Inducción en medio bifásico.

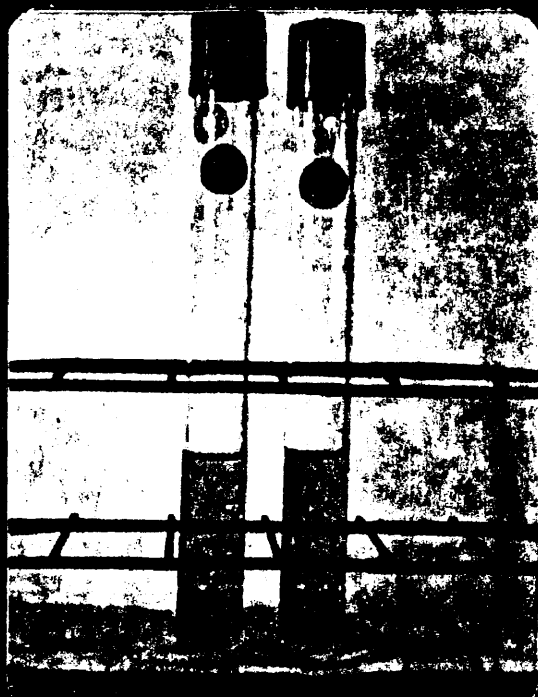
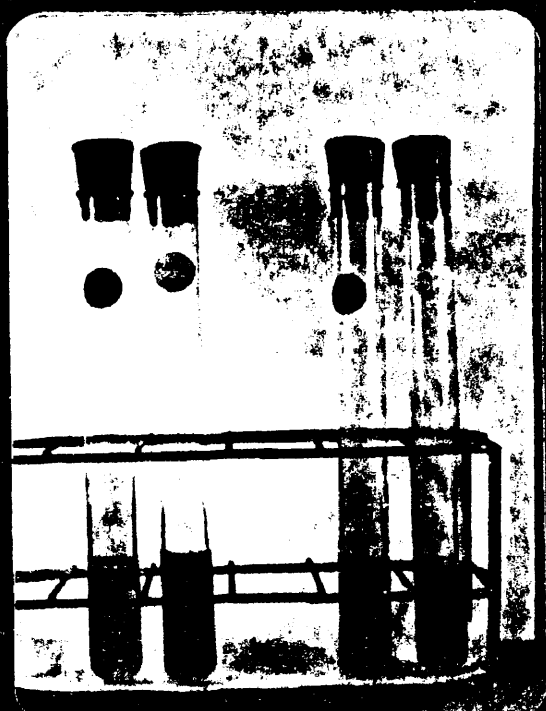
Las tinciones muestran formas filamentosas con cocos en - su interior y agregaciones de masas, el crecimiento sobre la superficie presenta unas colonias redondeadas de gran penetración en el agar, cuyo relieve vemos con la lupa estereoscópica. Son colonias más densas con granulaciones visibles - en su interior y de un crecimiento rápido. Realizando las - pruebas de identificación, correspondientes al Streptococcus viridans, se encontró que la única propiedad que perdía era la alfa-hemólisis.

MEDIOS DE CULTIVO.

180

Crecimiento en medio bifasico.

Crecimiento en medio con sacarosa.



181

FORMA L INDUCIDA DE STREPTOCOCCUS VIRIDANS.

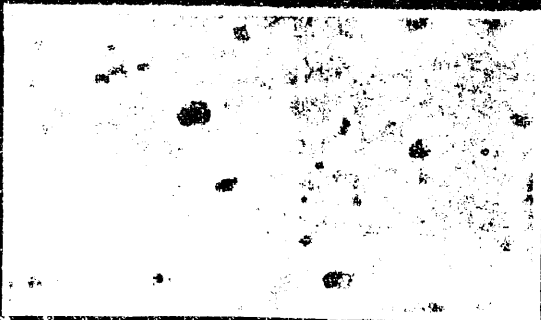
Induccion de forma L en medio bifasico. Incubacion 6 dias

Crecimiento en placa durante 7 dias

Resiembra en placa de agar 1,5%

Resiembra en placa de agar 0,8%

"



Inducción "in vivo".

En ningún caso observamos un efecto patógeno del Streptococcus viridans, pues no se produjo la muerte de ningún animal.

En los síntomas podemos destacar en general un adormecimiento de los animales a lo largo de los ensayos.

1^{er} ensayo.

Tinciones.

Líquido peritoneal.

Los ratones que han recibido 1000U/c.c. de penicilina al ser sacrificados a los 3 horas presentan formas filamentosas; a los 6 horas formas troceadas, y a las 24 horas se observan formas cocoides.

Los que se inyectaron con 2000U/c.c. y 6000U/c.c. presentan formas pequeñas aisladas a los 3 y 6 horas, mientras que a las 24 horas presentan formas cocoides.

Los ensayos efectuados con 12000U/c.c. apenas muestran variaciones a lo largo de las distintas horas de sacrificio, -- pues los tinciones efectuados presentan filamentos ténues -- con cocos diminutos entre sus entrecruzamientos.

Las masas de cocos diminutos aislados y los filamentos -- son iguales a los encontrados en las tinciones de la inducción "in vitro".

Sangre.

En los lotes que han recibido 1000U/c.c. observamos a las 3 y 6 horas presencia de estreptococos diminutos entre los glóbulos, pero a las 24 horas presentan tamaño de estreptococos normal.

En los inyectados con 2000U/c.c. observamos algunos leucocitos en fagocitosis, observando formas atacadas y disgregación total de leucocitos en los casos de inyección de 6000U/c.c. en todos los tiempos de sacrificio.

Existe ligera fagocitosis y escasas modificaciones en los casos de inyección de 12000U/c.c. en los diferentes tiempos de sacrificio.

Las pruebas de identificación se conservaron a lo largo de los ensayos; únicamente la propiedad de alfa hemolisis no se manifestó en cultivos de líquidos peritoneales y sangre de ratones sacrificados a las 6 horas después de inyección de 2000U/c.c.. Volviendo a recuperar esta propiedad en los casos de reversión. Por tanto esta propiedad solo se mantiene en los lotes de inyección de 1000U/c.c.

Serosidades.- Adherencias.

En los lotes inyectados con 6000U/c.c. encontramos unas mucosidades sobre las cápsulas suprarrenales en las que por tinción se observan agregados de cocos pequeños entre materia granular fagocítica y células epiteliales con cocos dimi

INDUCCION DE FORMA L "IN VIVO"

184

Siembra en placa liquido de peritoneo

Cultivo en agar PPLO

Inyeccion de 1000U/cc penicilina

Inyeccion de 2000U/cc penicilina

Sacrificio a las 3 horas

Sacrificio a las 6 horas

Inyeccion de 12.000U/cc penicilina

Inyeccion de 12000U/cc penicilina

Sacrificio a las 3 horas

Sacrificio a las 6 horas

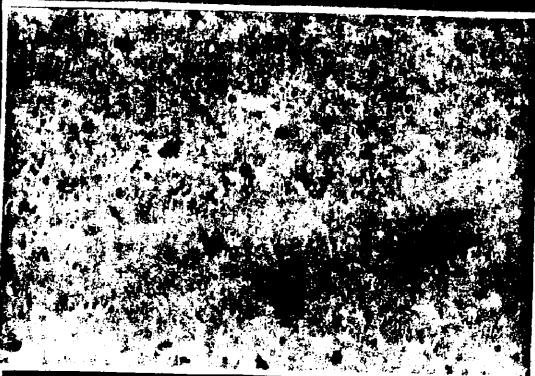
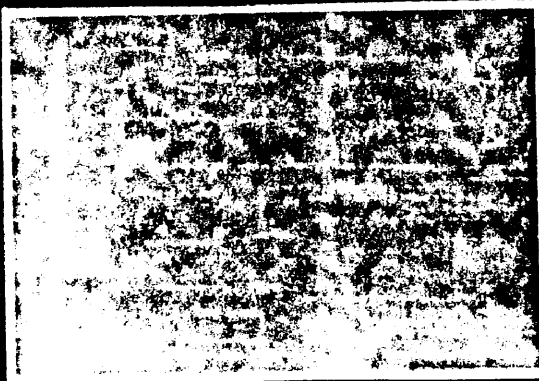
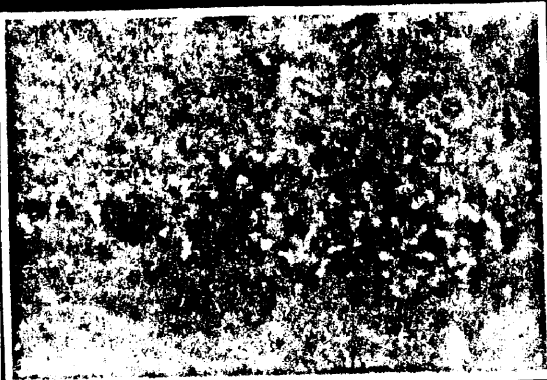
TINCIONES

Tincion Gram de liquido de peritoneo

Inyeccion de 1000U/cc penicilina Inyeccion de 1000U/cc penicilina

Sacrificio a las 3 horas

Sacrificio a las 24 horas



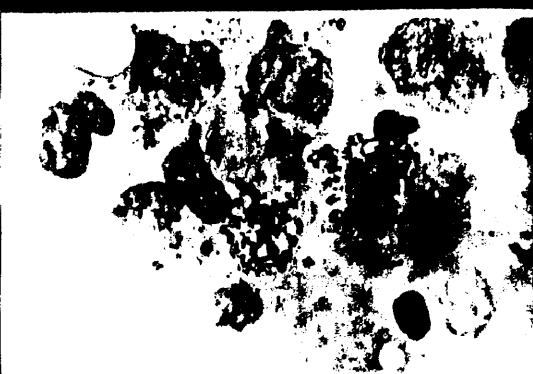
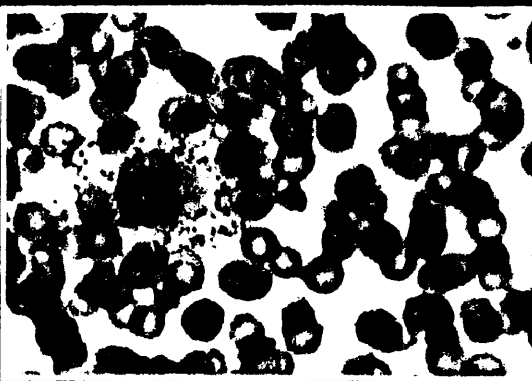
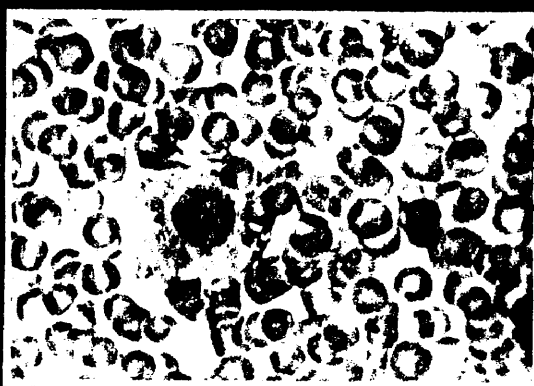
TINCION GIEMSA

185

Sangre de raton inoculado con Streptococcus viridans,inyectado con
2000U/cc de penicilina y sacrificado a las 24 horas.Fagocitosis

Sangre de raton inoculado con Streptococcus viridans,inyectado
con 6000U/cc de penicilina y sacrificados a las 24 horas.

Mucosidades adheridas a las capsulas suprarrenales.Celulas epitelia-
les,inyectado con 12.000/cc de penicilina,sacrificado a las 24 horas



nutos en su interior.

En las asas intestinales existen unas serosidades con formas cocoides entre espacios de material graso. Estas mucosidades y adherencia presentan formas fácilmente observables - en los lotes inyectados con 12000U/c.c. sacrificados a las 24 horas.

Placas.

Las siembras en placas con líquido peritoneal presentan formas marcadas en medio agar PPL0, observándose formas ténuas y puntiformes en líquido de ratón inyectado con 1000U/c.c. y sacrificado a las 3 horas.

En los lotes de inyección con 2000 y 6000U/c.c. las placas agar PPL0 presentan el crecimiento en las llamadas logunas granulosa encontradas también en la inducción "in vitro".

Es de recomendar la utilización del agar PPL0, con presencia de formas más marcadas y redondeadas pues en agar 0,8 % son formas ténuas e irregulares y en agar 1,5 % se presentan crecimientos puntiformes y poco visibles.

En general podemos afirmar que existe en todos los casos un pequeño número de microorganismos que revierten espontáneamente en los primeros cultivos de medios sin adición de penicilina, pero podemos destacar que en el ensayo de lotes inyectados con 12000U/c.c. y sacrificados a las 3, 6 y 24 horas en los que observamos formas irregulares de tamaño medio,

débilmente granulosas de semejanza a las encontradas en la inducción "in vitro". Fueron necesarias 6 resiembras en agar 0,8 % sin penicilina, para volver a encontrar formas típicas de crecimiento de Streptococcus viridans, lo que demostró la posibilidad de inducción de formas L por este método.

2º Ensayo.

Cuando inyectamos nuevas dosis de antibiótico a los ratones, al cabo de 10 horas de la inyección inicial, comprobamos en general que no existen apenas diferencias en las muestras entre los lotes sacrificados a las 3 ó 24 horas con las distintas unidades de penicilina, notando que las tinciones de líquido peritoneal y sangre toman mal los colorantes, observándose formas ténues pequeñas.

En los crecimientos en placas crecen formas irregulares - ténues.

Se mantienen las pruebas de identificación para Streptococcus viridans, repitiéndose la pérdida de la propiedad de alfa hemolisis.

Los exudados adheridos a las asas del intestino son de mayor tamaño que las observadas en el primer ensayo, existe -- más acumulación. Las cápsulas suprarrenales están desprendidas y los riñones inflamados.

En el caso de ratones sacrificados a las 3 horas fueron - necesarias 8 resiembras en medio ^{agar} 0,8 % y ^{medio} gelatina sin penici

1 ^o ENSAYO	3 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
1.000U/cc	LIQUIDO PERITONEAL	Formas filamentosas	Formas muy troceadas
TINCIONES	SANGRE	-	-
EXUDADOS	-	-	-
L. PERITONEAL			
PLACAS	AGAR PPLO	Formas tenues puntiformes	Crecimiento abundante
	AGAR 1,5%	Formas medianas	
	AGAR 0,8%	Formas granulosas	
	AGAR PPLO + PEN		
	AGAR 1,5% + PEN		
	AGAR 0,8% + PEN		
P. IDENTIFICACION Se mantienen.			
REVERSION 1 pase a placa sin penicilina... Revierten. <u>Streptococcus viridans</u>			
SANGRE	AGAR PPLO	Formas irregulares	
	AGAR 1,5%		
	AGAR 0,8%		
	AGAR PPLO + PEN	Formas de menor tamaño	
	AGAR 1,5% + PEN		
	AGAR 0,8% + PEN	en las placas	
P=IDENTIFICACION Se mantienen			
REVERSION 1 pase a placa sin penicilina ... Revierten. <u>Streptococcus viridans</u>			

:

1º ENSAYO	3 HORAS	5 HORAS	24 HORAS
2.000U/cc	LIQUIDO PERITONEAL — Formas irregulares	Formas aisladas	Formas coccoides
TINCIONES	SANGRE	muy pequeñas	Fagocitosis
	EXUDADOS	-	-

L. PERITONEAL	AGAR PPLO AGAR 1,5% AGAR 0,8% AGAR PPLO + PEN AGAR 1,5% + PEN AGAR 0,8% + PEN P. IDENTIFICACION. Perdida de alfa hemolisis. Las demas propiedades se mantienen REVERSION ... 2 resiembras en medios sin penicilina... Revierten
PLACAS	AGAR PPLO AGAR 1,5% AGAR 0,8% AGAR PPLO + PEN AGAR 1,5% + PEN AGAR 0,8% + PEN P. IDENTIFICACION... Perdida de alfa hemolisis... Las demas propiedades se mantienen REVERSION. 2 resiembras en medios sin penicilina... Revierten
SANGRE	

1º ENSAYO	3 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
5.0000/CC	LIQUIDO PERITONEAL Agregados tenues	-	-
TINCIONES	SANGRE	Formas alteradas	Fagocitosis
	EXUDADOS	Inflamacion capsulas suprarrenales	Mucosidades en asas intestinal
	L. PERITONEAL	AGAR PPLO	
		AGAR 1,5%	
		AGAR 0,8%	
		AGAR PPLO+ PEN	
		AGAR 1,5% + PEN	
		AGAR 0,8% + PEN	
		P. IDENTIFICACION.. Perdida de alfa hemolisis. Las demas propiedades se mantienen	
		REVERSION...4 resiembras en medios sin penicilina.. Revierten	
PLACAS		AGAR PPLO	
		AGAR 1,5%	
		AGAR 0,8%	
		AGAR PPLO+ PEN	
	SANGRE	AGAR 1,5% + PEN	
		AGAR 0,2% + PEN	
		P. IDENTIFICACION... Perdida de alfa hemolisis.. Las demas propiedades se mantienen	
		REVERSION...4 resiembras en medios sin penicilina.. Revierten	

1º ENSAYO		3 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
12.000U/cc	LIQUIDO PEPTONEAL	-	-	-
TINCIONES	SANGRE	Formas alteradas		
	EXUDADOS			
	L. PERITONEAL	AGAR PPLO AGAR 1,5% AGAR 0,8% AGAR PPLO+ PEN AGAR 1,5% + PEN AGAR 0,8% + PEN	Agregaciones redondeadas Agregaciones tenues	
		P. IDENTIFICACION... Perdida de alfa hemolisis. Las demas propiedades se mantienen REVERSION... Pasan a formas tenues ... resiembras... Revierten		
	PLACAS	AGAR PPLO AGAR 1,5% AGAR 0,8% AGAR PPLO + PEN AGAR 1,5% + PEN AGAR 0,8% + PEN	Formas tenues granulosas redondeadas	
	SANGRE	P. IDENTIFICACION... Perdida de alfa hemolisis. Las demas pruebas de identificacion se mantienen. REVERSION... 6 pases a placa sin penicilina... Revierten		

22 ENSAYO

3 HORAS

24 HORAS

12.0001/cc

TRACCIONES

LIQUIDO PERITONEAL

SANGRE

EXUDADOS — Mucosidades en asas de intestino

Toman dificilmente los colorantes

Formas tenues
irregulares. Fagocitosis

L. PERITONEAL

PLACAS

SANGRE

AGAR PPLO

AGAR 1,5%

AGAR 0,8%

AGAR PPLO + PEN

AGAR 1,5% + PEN

AGAR 0,8% + PEN

P. IDENTIFICACION.. Perdida alfa hemolisis.. Las demas pruebas se mantienen

REVERSION... 8 resiembras medio sin penicilina... Revierten

AGAR PPLO

AGAR 1,5%

AGAR 0,8%

AGAR PPLO + PEN

AGAR 1,5% + PEN

AGAR 0,8% + PEN

P. IDENTIFICACION.. Perdida de alfa hemolisis.. Las demas pruebas se mantienen

REVERSION.. 8 resiembras en medio sin penicilina... Revierten

Formas tenues
troceadas

Formas tenues
irregulares

Formas tenues
escasas

lina para encontrar nuevamente el estreptococo de origen.

ESTUDIOS PARA COMPARACIÓN DE MICOPLASMAS Y FORMA L INDUCIDA.

12.- Pruebas de crecimiento.

A) Influencia de la consistencia del agar.

Por presentar los formas de crecimiento morfológicas difíciles de describir, decidimos realizar fotos para presentar los resultados y exponer una opinión general de las formas observadas.

La observación de los crecimientos de micoplasmas sobre placas, nos muestra que en agar blando (agar 0,8 %), las colonias adquieren mayor tamaño en su interior presentan granulaciones, como vemos por comparación de las fotos. Cuando estos cultivos son sometidos a incubación durante varios días, comprobamos cómo la consistencia del agar está íntimamente relacionada con el envejecimiento de la colonia, de tal manera que en los cultivos sobre agar 0,8 % las granulaciones aparecen antes, las colonias se trocean desintegrando su morfología, antes que en los otros medios de cultivo.

Los crecimientos sobre agar PPLO presentaron en este ensayo formas ya observadas para los micoplasmas y la forma L, por ello las fotos no aparecen aquí, pertenecen a sus capítu

MYCOPLASMA FERMENTANS.

197

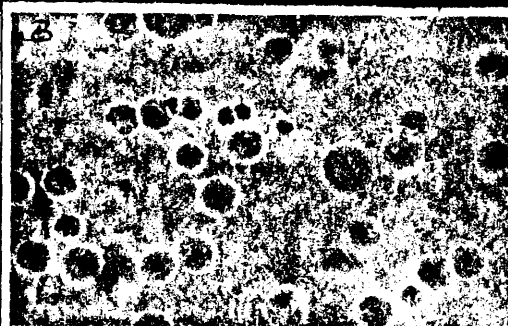
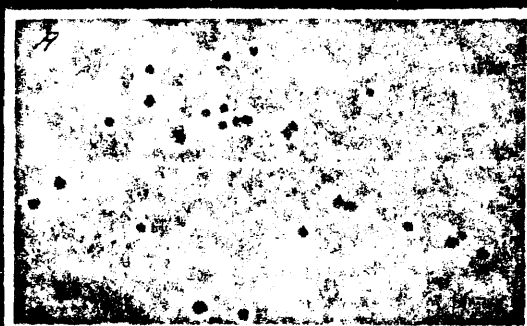
Colonias de un cultivo de 4 días en placas de:

A- agar 1,5%.

B- agar 1,5% con penicilina.

C- agar 0,8%.

D- agar 0,8% con penicilina.



INFLUENCIA DE LA DUREZA DEL AGAR

AGAR 1,5% ——— Formas típicas "huevo frito" Tamaño pequeño

AGAR 1,5% + PEN — Formas típicas. Tamaño medio y formas puntiformes.

AGAR 0,1% ——— Formas típicas granuladas. Tamaño medio. Envejecimiento rápido.

AGAR 0,2% + PEN ——— Formas típicas. Tamaño medio. Formas puntiformes sobre el agar.

AGAR PPLO

AGAR PPLO + PEN

MICROORGANISMO: MYCOPLASMA FERMENTANS

INFLUENCIA DE LA DUREZA DEL AGAR

AGAR 1,5% ——— Formas redondeadas con punto central Tamaño medio Algunas puntiformes

AGAR 1,5% + PEN ——— Troceamientos sobre la superficie. En resiembras crecen con la misma morfología

AGAR 0,8% ——— Formas grandes con centro marcado. A traves de los dias de incubacion aparecen granulaciones muy marcadas en su interior.

AGAR 0,8% + PEN ——— Troceamientos sobre la superficie de la placa, son mas tenues que las observadas en el crecimiento en placa de agar 0,8%

AGAR PPLO

AGAR PPLO + PEN

MICROORGANISMO: MYCOPLASMA CEPA T

INFLUENCIA DE LA DUREZA DEL AGAR

AGAR 1,5% ——— Formas redondeadas escasas Algunas troceadas debiles

AGAR 1,5% + PEN ——— Agregaciones redondeadas y troceamientos de tamaño medio

AGAR 0,8% ——— Formas redondeadas escasas de tamaño medio y formas puntiformes

AGAR 0,8% + PEN ——— Agregaciones de tamaño medio con granulaciones en su interior

AGAR PPLO

AGAR PPLO + PEN

-197-

MICROORGANISMO: MYCOPLASMA ORALE TIPO 1

INFLUENCIA DE LA DUREZA DEL AGAR

AGAR 1,5% ——— Formas irregulares tenues, escasas

AGAR 1,5% + PEN — Formas irregulares tenues escasas. Algunas con tendencia a redondeadas

AGAR 0,8% ——— Agregaciones de tamaño medio y pequeño. Crecen hacia el interior.

AGAR 0,8% + PEN — Formas puntiformes escasas

AGAR PPLO

AGAR PPLO + PEN

-198-

MICROORGANISMO: FORMA L INDUCIDA DE STREPTOCOCCUS VIRIDANS

los correspondientes.

B) Influencia de las distintas unidades de penicilina.

Al relacionar los factores: consistencia del agar y utilización de distintas unidades de penicilina para los cultivos de micoplasmas y forma L inducida, encontramos la confirmación de los resultados obtenidos en los trabajos anteriores.

En el agar de consistencia 0,8 % se presentan crecimientos cuyas colonias adquieren mayor tamaño, pero podemos recomendar la utilización del agar 1,5 % pues es más fácil su manejo para tinciones, presenta un envejecimiento más lento de las colonias y su conservación es más idónea.

En este ensayo ya no solo vemos que las diferentes unidades de penicilina están en proporción inversa al número de microorganismos viables, sino que también nos permite, por utilizar una escala de unidades más detallada, comprobar la relación entre la adición de la penicilina a los medios con distinta consistencia de agar y su acción sobre los microorganismos, siendo esta influencia notable para los cultivos de Mycoplasma cepa I, como vemos en las fotos.

Las tinciones comparativas de los cultivos en agar de consistencia blanda, nos muestran formas filamentosas que contienen en su interior formas cocoides de gran tamaño (a semejanza de la forma L). Al adicionar a estos medios penicilina, aparecen formas cocoides de menor tamaño y con dificultad pa

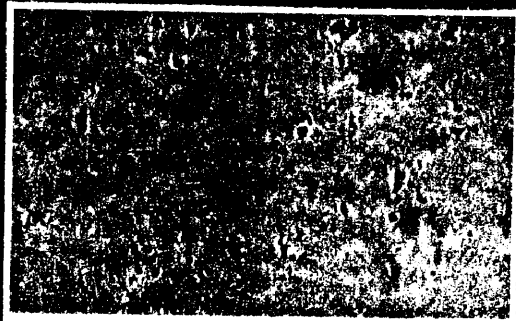
MYCOPLASMA CEPA T

200

Cultivos de 4 días en placa

Medio agar 0,8%

Medio agar 0,8% con penicilina.



-let-

ra tomar los colorantes.

El crecimiento en Agar Columbia presenta formas típicas - de gran tamaño para los micoplasmas y formas más destacables para el crecimiento de la forma L inducida, es un medio de - alto contenido nutricional.

Los micoplasmas tomados para presentación de fotos fueron el Mycoplasma fermentans y el Mycoplasma laidlawii, pues son los que toman formas más destacadas para la comparación. - - Igualmente como las formas más destacadas eran las sometidas a 4000 y 16000U/c.c., son las que se tomaron de ejemplos.

Los cultivos en medios líquidos de 4000U/c.c. de Mycoplasma fermentans nos muestran en los crecimientos en placas que el medio sobre el que aparecen morfologías más típicas es el Agar Columbia, pero es de gran riesgo de contaminación y el envejecimiento de las formas sobre él cultivadas aparece antes. En el agar PPLO con 4000U/c.c., el crecimiento es tan - abundante que las formas se superponen, la forma L en este - cultivo es tan ténue que no puede definirse.

La comparación de la ausencia o presencia de penicilina G sódica en estos cultivos se observa claramente en las fotos.

Para cultivos líquidos de 16000U/c.c. de Mycoplasma fermentans, sigue siendo el medio agar Columbia con 16000U/c.c. el que presenta morfología más destacable. Aunque cultivos - sobre agar PPLO con 16000U/c.c. al estar muy disminuido el - número de microorganismos, las colonias de los presentes son

MYCOPLASMA FERMENTANS.

202

Colonias de un cultivo de 6 días en placa:

A- M. liquido --M.Hayflick con 4000U/cc de penicilina.

Placa --agar PPLO con 4000U/cc de penicilina.

B-M. liquido-- M.Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --agar PPLO con 16.000U/cc de penicilina.

C-M. liquido--M.Hayflick con 4000U/cc de penicilina.

Placa --agar PPLO.

D-M. liquido-- M. Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --agar PPLO.

E-M. liquido--M.Hayflick con 4000U/cc de penicilina.

Placa --agar 1,5% con 4000U/cc de penicilina.

F-M. liquido--M.Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

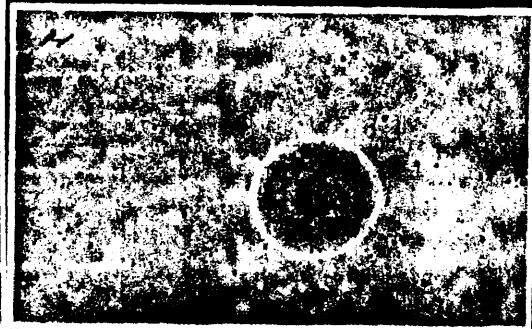
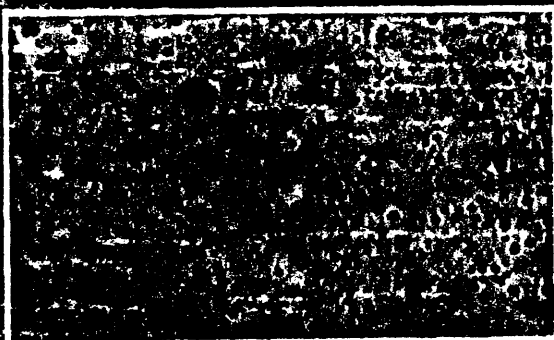
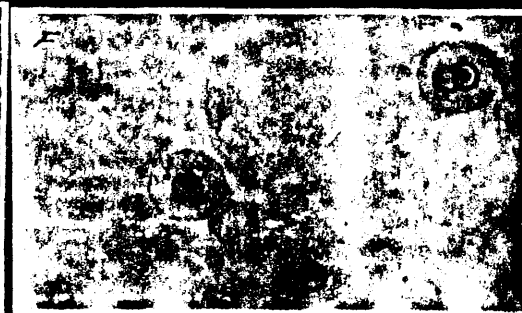
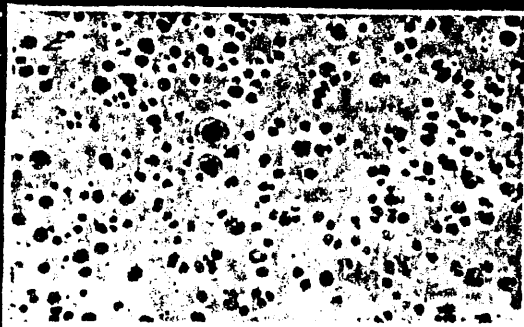
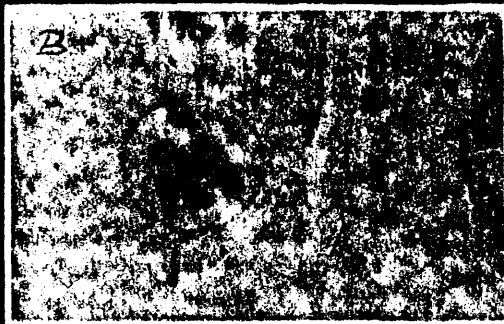
Placa agar 1,5% con 16.000U/cc de penicilina.

G-M. liquido--M.Hayflick con 4000U/cc de penicilina.

Placa --agar 1,5%.

H- M. liquido--M.Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 1,5%.



MYCOPLASMA FERMENTANS.

203

Colonias de un cultivo de 6 dias en placa de:

A-M. liquido--M.Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 0,8% con 4.000U/cc de penicilina.

B-M. liquido--M.Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 0,8% con 16.000U/cc de penicilina.

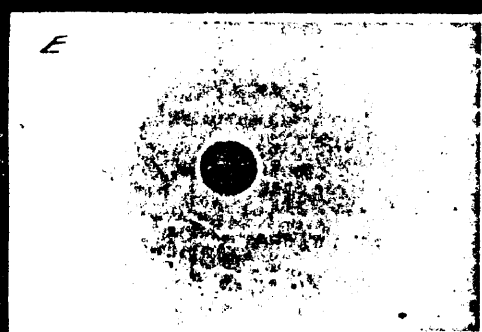
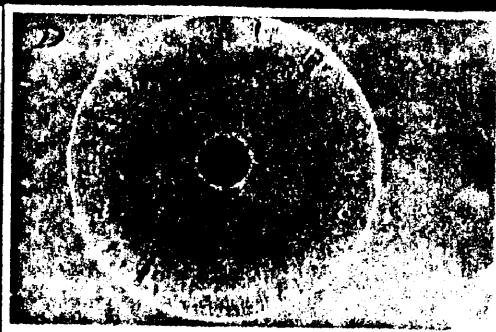
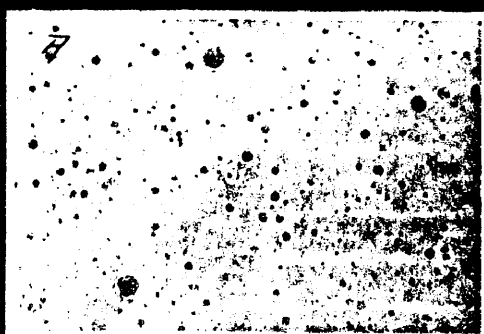
C-M. liquido--M.Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --M.Columbia con 4.000U/cc de penicilina.

D-M. liquido--M.Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --M.Columbia con 16.000U/cc de penicilina.

E- Cultivo foto D a los 10 dias de incubacion.



MYCOPLASMA LAIDLAWII.

204

Colonias de un cultivo de 6 dias en placa de:

A-M. liquido--M. Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --agar PPLO con 4.000U/cc de penicilina.

B-M. liquido--M. Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --agar PPLO con 16.000U/cc de penicilina

C-M. liquido--M. Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --agar PPLO.

D-M. liquido--M. Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --agar PPLO.

E-M. liquido--M. Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 1,5% con 4.000U/cc de penicilina.

F-M. liquido--M. Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

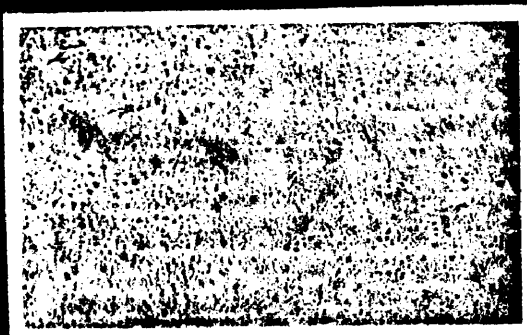
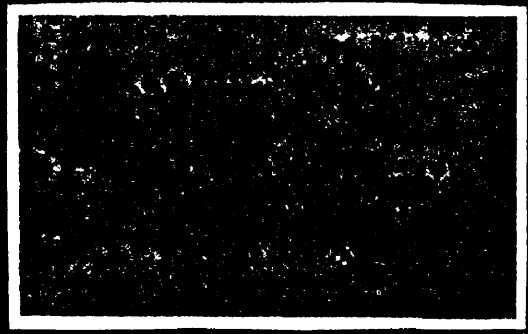
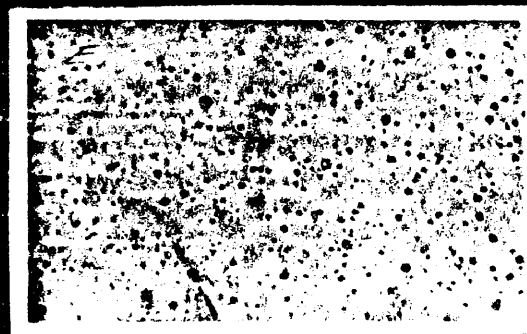
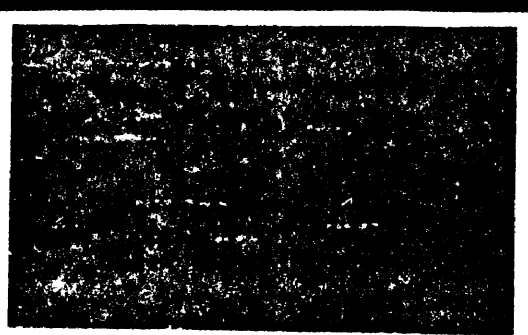
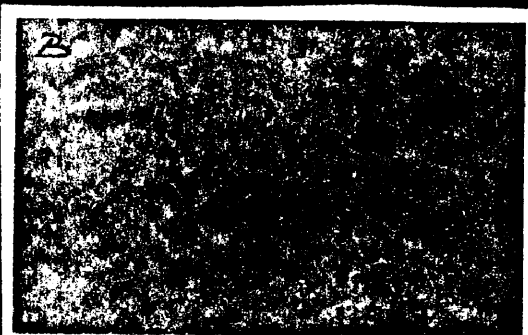
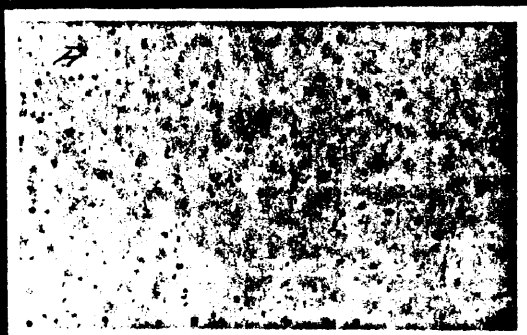
Placa --agar 1,5 con 16.000U/cc de penicilina.

G-M. liquido--M. Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 1,5%.

H-M. liquido--M. Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 1,5%.



MYCOPLASMA LAIDLAWII.

205

Colonias de un cultivo de 6 dias en placa de:

A-M. liquido--M. Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 0,8% con 4.000U/cc de penicilina.

B-M. liquido--M. Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 0,8% con 16.000U/cc de penicilina.

C-M. liquido--M. Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 0,8%.

D-M. liquido--M. Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --agar 0,8%.

E-M. liquido--M. Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --M. Columbia con 4.000U/cc de penicilina.

F-M. liquido--M. Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

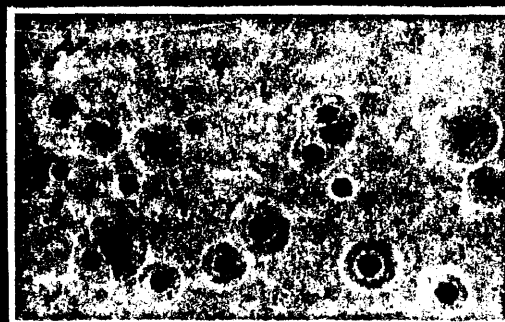
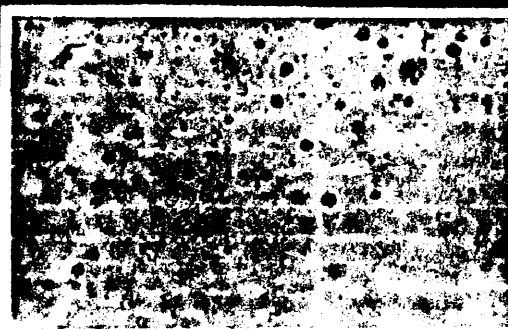
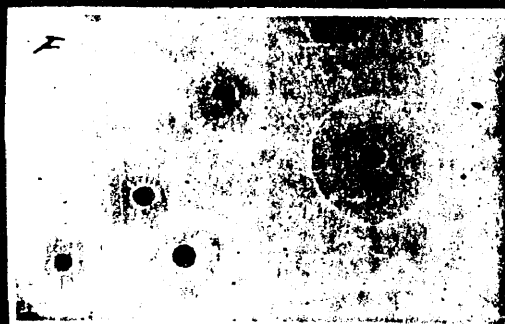
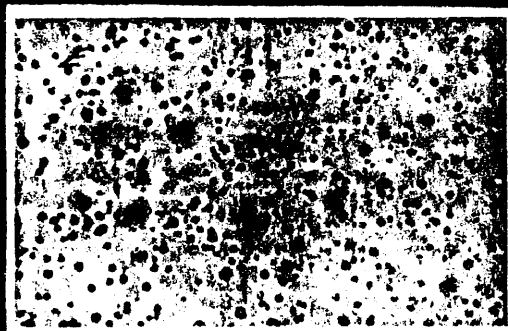
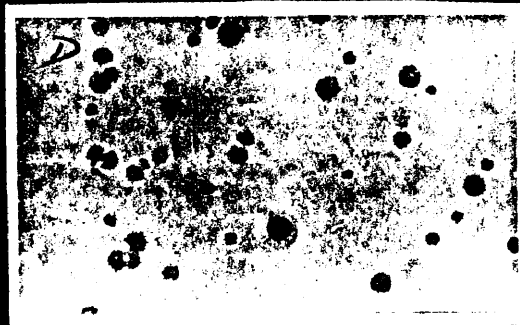
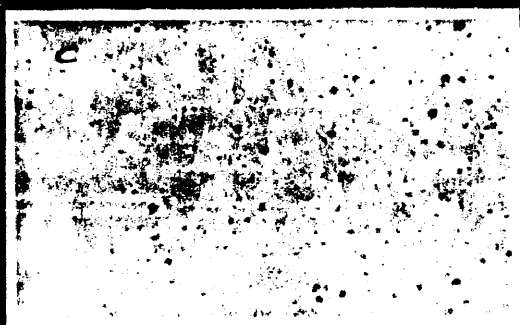
Placa --M. Columbia con 16.000U/cc de penicilina.

G-M. liquido--M. Hayflick con 4.000U/cc de penicilina.

Placa --M. Columbia.

H-M. liquido--M. Hayflick con 16.000U/cc de penicilina.

Placa --M. Columbia.



claramente observables.

Para cultivos de Mycoplasma laidlawii crecidos en medios líquidos con 4000U/c.c. sigue siendo el agar Columbia con -- 4000U/c.c. el más visible.

Cuando este microorganismo se siembra en medios con - - - 16000U/c.c. de penicilina, el número de microorganismos queda claramente disminuido, como deducimos de la comparación de las fotos, de tal manera que a veces, de crecimiento indeterminable que se extiende sobre toda la superficie de la placa, pasamos a la observación de formas aisladas, cuya morfología está perfectamente determinada.

La observación de las modificaciones de la forma L inducida, con respecto a las diversas unidades de penicilina agregadas a los medios de cultivo, fueron observados inicialmente en el capítulo de inducción, comprobando en este trabajo que esta forma es capaz de vivir en medios que contienen 16000U/c.c. de penicilina, de tal forma que al ser cultivados en medios con estas unidades y luego sembrados a medios con - - 4000 y 2000U/c.c., se nos presenta un retraso en el crecimiento, sus colonias son redondeadas, pero su morfología se hace más irregular, presentando formas defectuosas y troceadas en sus tinciones.

Las pruebas de identificación de cada microorganismo se mantienen en cada caso para cada ensayo. Destacando la pérdida de la propiedad de alfa hemólisis característica del - --

Streptococcus viridans.

C) Influencia de medios enriquecidos.

Las formas morfológicamente más perfectas para los cultivos de micoplasmas y de forma L inducida aparecen sobre agar PPL0, como observamos en las fotos, destacando que estas formas son más estables a través del envejecimiento y más fáciles de manejar para las tinciones, identificaciones y conservación.

En los cultivos en medio agar 1,5 % con adición de suero de caballo al 10 %, observamos el crecimiento de formas típicas de mayor tamaño que las que aparecen en el medio anteriormente citado, como observamos en las fotos, pero son formas de gran inestabilidad, pues aparece antes el envejecimiento. Igualmente comprobamos que el riesgo de contaminación aumenta.

En las tinciones de las formas irregulares pequeñas que aparecen sobre la superficie de las placas, observamos con tinción Gram, finos filamentos frágiles con cocos pequeños en su interior que toman difícilmente los colorantes Dienes y May-Grünwald.

Para la forma L apenas notamos diferencias en los cultivos sobre medio agar PPL0 o en los cultivos sobre agar 1,5 % adicionado con 10 % de suero de caballo, pero sí en los crecimientos sobre medio agar PPL0 con adición de penicilina, -

MYCOPLASMA FERMENTANS.

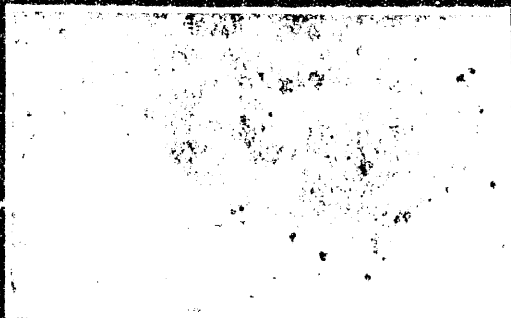
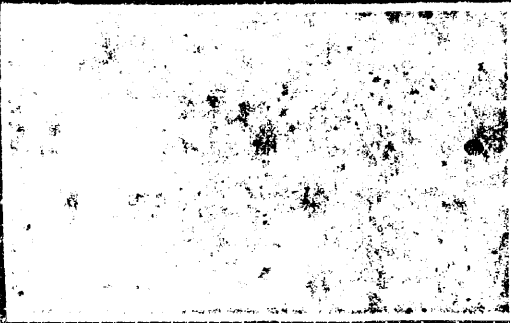
208

Colonias de un cultivo de 6 dias de incubacion en placas de
medios:

Agar PPLO.

Agar Columbia.

Agar PPLO con adicion de suero de caballo.



FORMA L INDUCIDA.

209

Crecimiento en medio bifásico con 13.222U/cc de penicilina

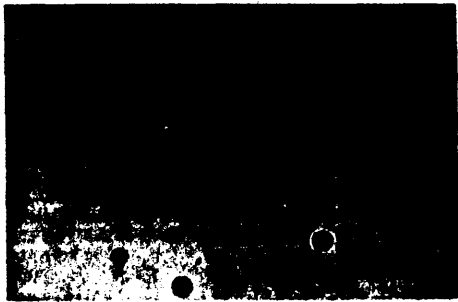
Cultivo de 7 días en placa

Agar 1,5% con suero de caballo

Agar PPLO

Agar PPLO con penicilina

"



INFLUENCIA DE MEDIOS ENRIQUECIDOS.

AGAR PPLO ——— Formas típicas "huevo frito". Tamaño grande.

AGAR PPLO + PEN ——— Formas redondeadas con punto central

AGAR 1,5% + SUERO ——— Formas típicas grandes granulosas. Medio con riesgo de contaminación.

CABALLO

AGAR COLUMBIA ——— Formas gigantes granulosas. Se disgregan con rapidez

-210-

MICROORGANISMO: MYCOPLASMA FERMENTANS.

INFLUENCIA DE MEDIOS ENRIQUECIDOS.

- AGAR PPLO ——— Formas redondeadas delimitadas con granulaciones en su interior Tamaño medio
- AGAR PPLO + PEN ——— Formas irregulares tenues y algunas redondeadas. Crecen hacia el interior
- AGAR 1,5% + SUERO Formas redondeadas con bordes marcados, granulaciones en su interior.
CABALLO Tamaño medio
- AGAR COLUMBIA ——— Formas gigantes granulosas

-211-

MICROORGANISMO: FORMA L INDUCIDA DE STREPTOCOCCUS VIRIDANS.

INFLUENCIA DE MEDIOS ENRIQUECIDOS.

AGAR PPLO ——— Formas típicas

AGAR PPLO + PEM ——— Formas redondeadas con granulaciones en el interior, punto central.
Algunas formas puntiformes e irregulares. Tamaño medio

AGAR 1,5% + SUERO ——— Formas grandes con granulaciones muy marcadas en su interior. Enveje-
cimientto rapido y gran riesgo de contaminacion. Tamaño grande

AGAR COLUMBIA ——— Formas típicas grandes, muy granulosas

MICROORGANISMO: MYCOPLASMA CEPA T

observando formas de morfología diferente a manera de masas granulosas en cuyo interior se presentan cocos muy pequeños.

2º.- Pruebas de identificación en la comparación.

A) Filtración.

En la filtración de micoplasmas observamos en nuestros trabajos que cuando utilizamos los filtros Millipore de poro 0,45 y 0,22 μ m con la fuerza del vacío o con jeringa, no se presentan modificaciones ni en el número de microorganismos ni en su morfología como comprobamos con lecturas en espectrocolorímetro y en los cultivos en placas de los líquidos de crecimiento, antes y después de la filtración. Así, cultivos en placas de los filtros utilizados demuestran que no son capaces de retener estos microorganismos, pues denotan ausencia de crecimiento.

Al utilizar filtros EKA para los micoplasmas, observamos que el número de microorganismos queda muy alterado tanto en número como en su morfología. Al cultivar restos de filtros en sus crecimientos se presentan formas muy troceadas débiles, con lagunas granulosas en la superficie.

En la filtración de los cultivos de Streptococcus viri- dans se demuestra que este microorganismo queda retenido en todos los filtros (Millipore y EKA), no existiendo crecimiento en las placas sembradas con los líquidos de filtrado y sí

un gran crecimiento en los cultivos de los filtros.

Las lecturas de los líquidos de filtración en espectrocolorímetro, nos muestran que no poseen microorganismos como - para detectar lectura.

Para la forma L inducida observamos que pasa a través de los filtros Millipore tanto de 0,45 como de 0,22 μ m de poro, pero es de destacar que cuando realizamos el 1^{er} ensayo, utilizando el vacío, las formas aparecen después en los cultivos en placa ligeramente deformados, mientras que cuando realizamos el 2^o ensayo, con la utilización de jeringa, se observa más claramente los cultivos de sus formas ténues típicas, sin apenas modificaciones.

La forma L inducida pasa a través de filtros EKA, observándose una ligera disminución del número de microorganismos crecidos sobre las placas sembrados con los líquidos de cultivo, apareciendo escasas formas ténues en la superficie de las placas de incubación de los filtros después del ensayo.

Tinciones de estos formas de crecimiento de los cultivos de los líquidos filtrados nos muestran las mismas propiedades con respecto a los colorantes como los ya descritos.

Las pruebas de identificación de los microorganismos se mantienen a través de todos los ensayos.

B) Digitonina.

Comprobamos la posibilidad de cultivos de micoplasmas en medio líquido Hayflick en el que la adición de líquido ascítico ha sido sustituida por un 20 % de sacarosa, dando lugar a crecimientos en los que se mantiene la morfología e identificación de estos microorganismos.

El crecimiento en tubo presenta la formación de una redícula de gran crecimiento formado por una agregación algodonosa en el fondo.

Tinción de estos líquidos muestran para los micoplasmas la presencia de formas bipolares y anillos muy pequeños.

Por ser el Mycoplasma fermentans y el Mycoplasma laidlawii los de mayor crecimiento, son los que tomamos como modelos de comparación con la forma L inducida, para observar sus comportamientos.

Las curvas trazadas tomando las lecturas de la densidad óptica respecto a la concentración de digitonina agregadas, presentan diferentes datos según cada micoplasma, pero es común a todos ellos la disminución de los valores de turbidez en el tramo final con respecto al inicial, y casi siempre en relación directa con la concentración de digitonina utilizada.

La curva correspondiente a la forma L presenta incluso con la dosis mínima (7 ug) una variación muy brusca. Luego -

aparece un período de adaptación y nuevamente observamos una línea de escasa variación respecto al crecimiento inicial.

La observación microscópica de las tinciones de estos cultivos líquidos de micoplasmas y forma L, muestran la pérdida de la capacidad de fijar los colorantes, encontrando formas ténues disminuidas de tamaño y troceadas.

Al sembrar en placas estos cultivos líquidos muestran crecimientos de formas ténues irregulares que mantienen las - - pruebas de identificación.

Lecturas en espectrocólorímetro para Mycoplasma fermentans:

Lectura inicial	0,990
7 ug	0,181
15 ug	0,181
30 ug	0,181
60 ug	0,174
120 ug	0,171
240 ug	0,168

Lecturas en espectrocólorímetro para Mycoplasma laidlawii:

Lectura inicial	0,204
7 ug	0,200
15 ug	0,195
30 ug	0,197
60 ug	0,190
120 ug	0,187
240 ug	0,184

Lecturas en espectrocolorímetro para Forma L inducida:

Lectura inicial	0,400
7 ug	0,377
15 ug	0,387
30 ug	0,398
60 ug	0,398
120 ug	0,398
240 ug	0,409

C) Patogenia y persistencia.

En ninguna de los casos se produjo la muerte de ningún -- animal. Se puede por tanto afirmar que no existe patogenia - mortal para el ratón inoculado con micoplasmas humanos, - -- Streptococcus viridans, y forma L inducida.

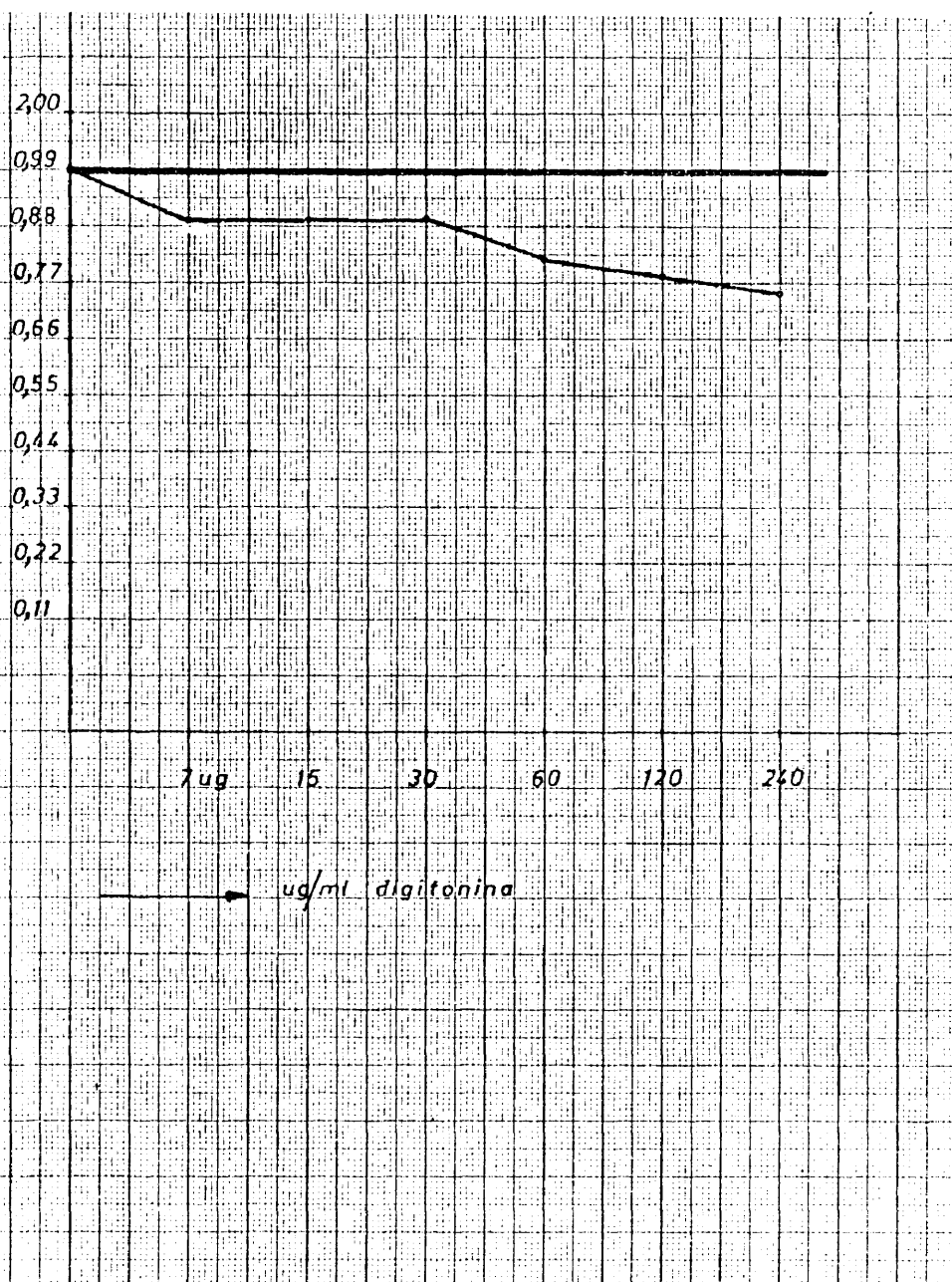
Se presentan únicamente síntomas destacables para aquellas inoculados con suspensión de Streptococcus viridans en los - que se observan signos de adormecimiento y temperatura.

Tinciones.

Mediante tinciones Gram, Dienes, May-Grünwald y Giemsa en sangre, líquidos y serosidades, se observan las formas típicas de micoplasmas, cocos de gran tamaño para Streptococcus viridans (formando cadenas muy visibles) y agregaciones débiles de gran ataque a los leucocitos y linfocitos para las muestras de forma L.

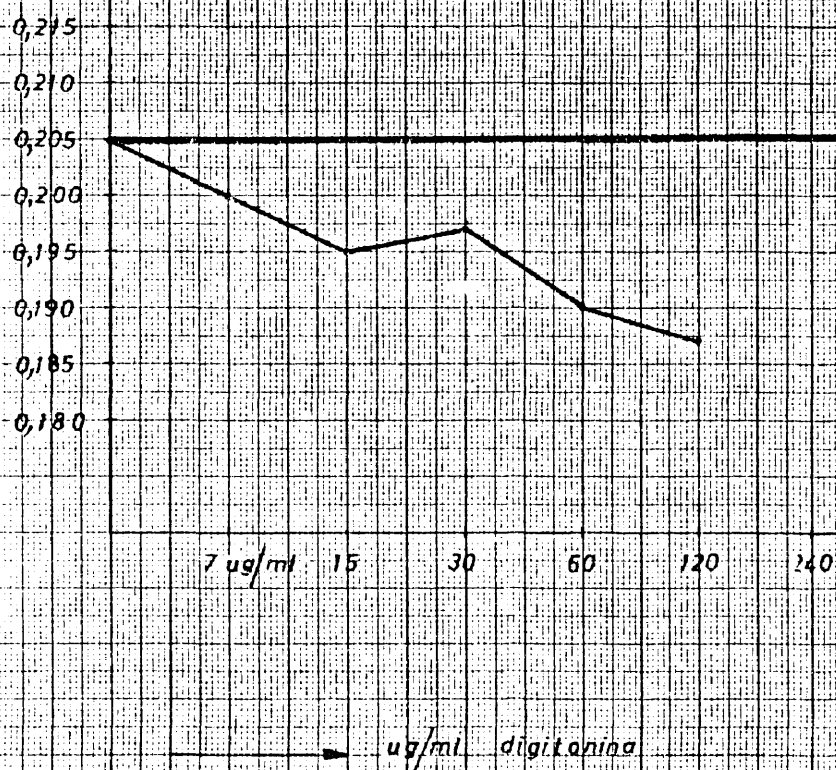
Curva de comportamiento de Mycoplasma fermentans
frente a concentraciones crecientes de digito-
nina

-218-

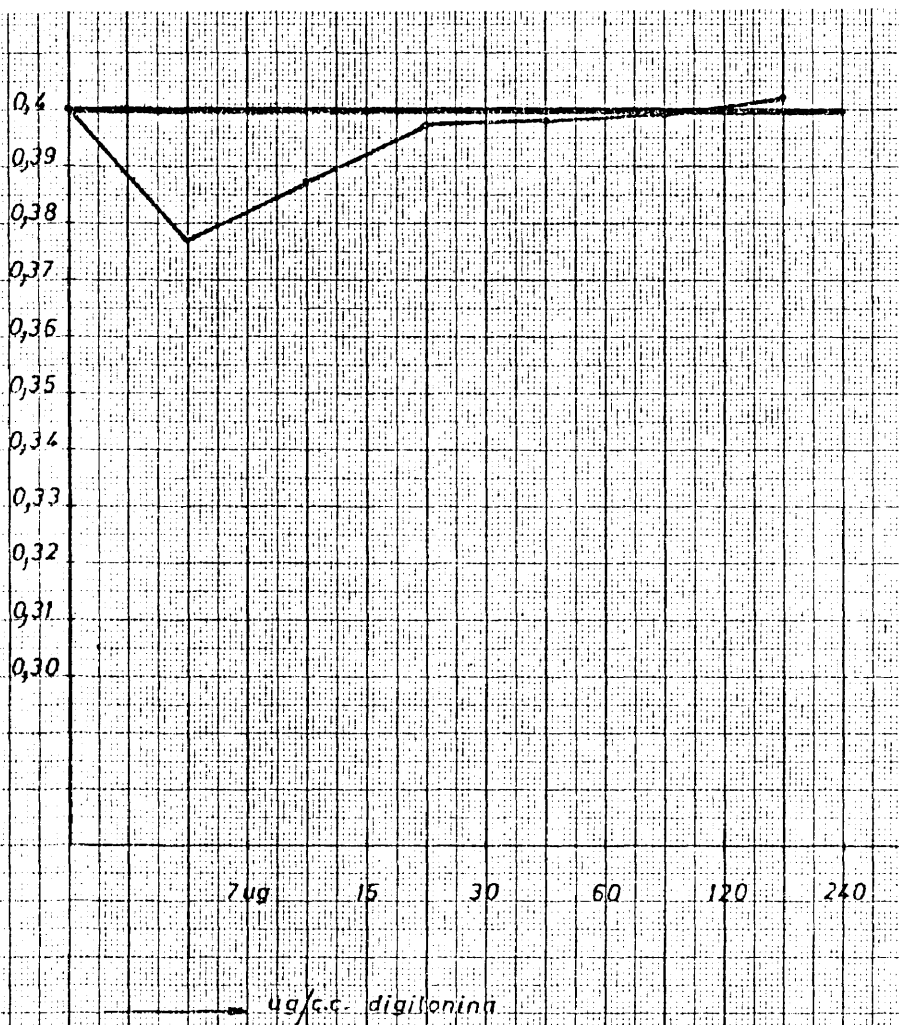


Curva de comportamiento de Mycoplasma laidlawii
frente a concentraciones crecientes de digito-
nina.

-219-



Curva de comportamiento de forma L de Streptococcus viridans frente a concentraciones crecientes de digitonina.
-220-



La colección de fotos nos muestran estos diversos comportamientos. Sangre de los animales sacrificados a los 8 y 9 -- días, muestran una gran cantidad de células mononucleares y exudados polinucleares.

Placas.

Los cultivos de líquido peritoneal y sangre de ratones -- inoculados con Mycoplasma fermentans, sacrificados del día 1 al 5, presentan en placas de agar PPLO crecimiento en forma de "lagunas granulosas".

Cultivos de muestras de ratones sacrificados al cabo de 5 o 10 días de la inoculación, crecen en formas ténues.

Para los animales inoculados con Mycoplasma laidlawii y -- sacrificados del día 1 al 20, se observan formas ténues redondeadas.

Ratones inoculados con Streptococcus viridans muestran o -- lo largo de todos los ensayos formas y pruebas de este micro organismo sin variación.

Muestras de ratones inoculados con la forma L presentan -- un crecimiento de formas ténues irregulares en los cultivos de líquido peritoneal y sangre, formas que desde las muestras de los sacrificios del día 6 al 10 se van haciendo más redondeadas, semejantes a los encontrados en los ensayos anteriores.

Las pruebas bioquímicas se mantienen durante todo el tra-

bajo.

Es de destacar que los animales, a partir del ratón sacri
ficado el día 6, presentan las cápsulas suprarrenales despren
didas con aumento de tamaño.

Por comparación en las fotos podemos observar las mues- -
tras de tinciones y cultivos obtenidas.

Podemos por tanto afirmar que la forma L persiste durante
los 10 días que duró la experiencia. Persisten sin presentar
variaciones, pues es idéntica a la inoculado y no se encuen-
tra en ningún caso en los ratones sacrificados en el lote --
control.

223

CULTIVOS EN PLACAS DE LIQUIDO DE PERITONEO DE RATON

Raton inoculado con forma L. Sacrificado a los 5 dias

Placas incubadas durante 7 dias

Agar PPLO

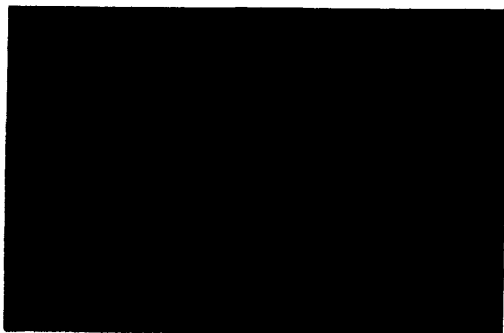
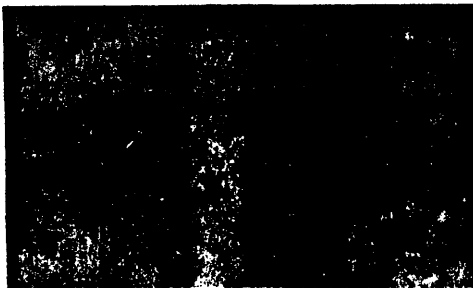
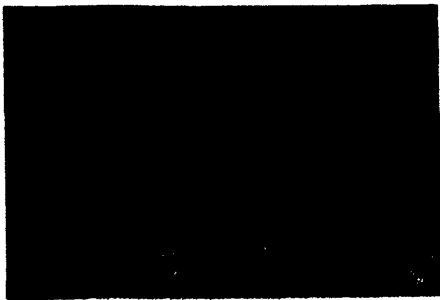
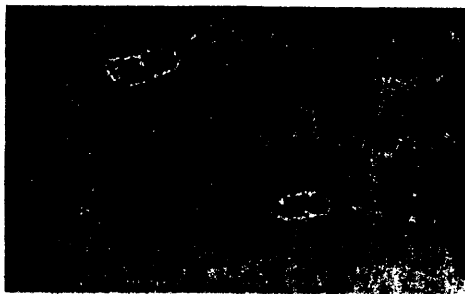
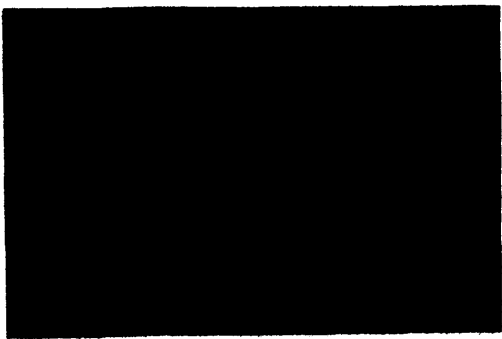
Agar PPLO con penicilina

Agar 0,8%

Agar 0,8% con penicilina

Agar 1,5%

Agar 1,5% con penicilina

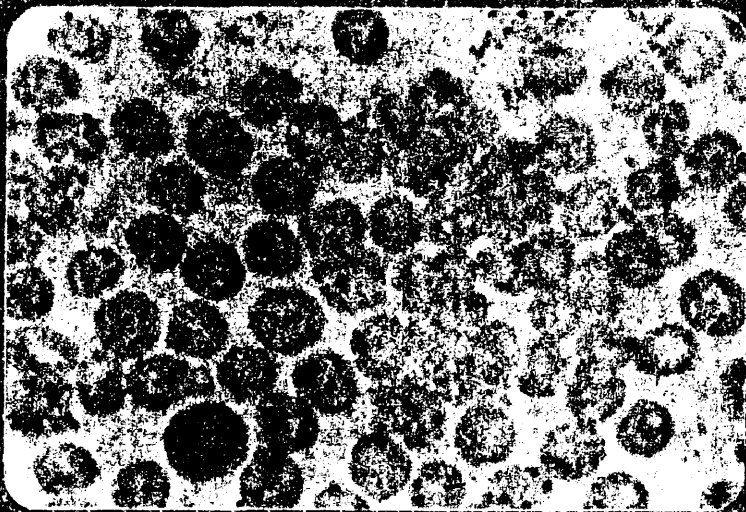
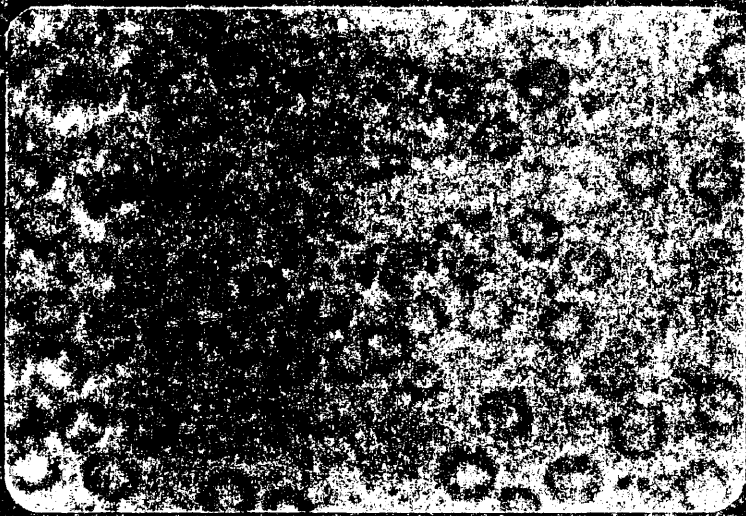


224

TINCION GIEMSA-SANGRE DE RATON.

Sangre de raton inoculado con Mycoplasma fermentans sacri-
ficado a los 4 dias.

Sangre de raton inoculado con Streptococcus viridans
sacrificado a los 4 dias.



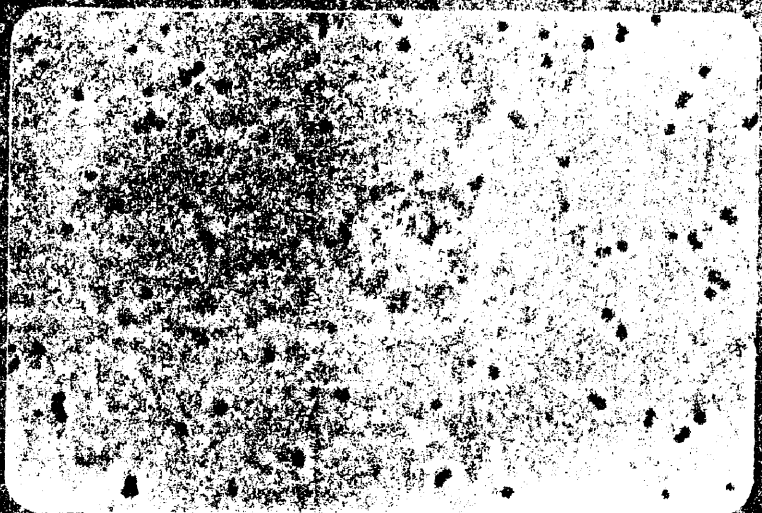
225

TINCION GIEMSA LIQUIDO DE PERITONEO

Raton inoculado con Streptococcus viridans, sacrificio a los
5 dias

Raton inoculado con Mycoplasma fermentans, sacrificio a los
5 dias

Raton inoculado con Streptococcus viridans, sacrificio a los
10 dias.



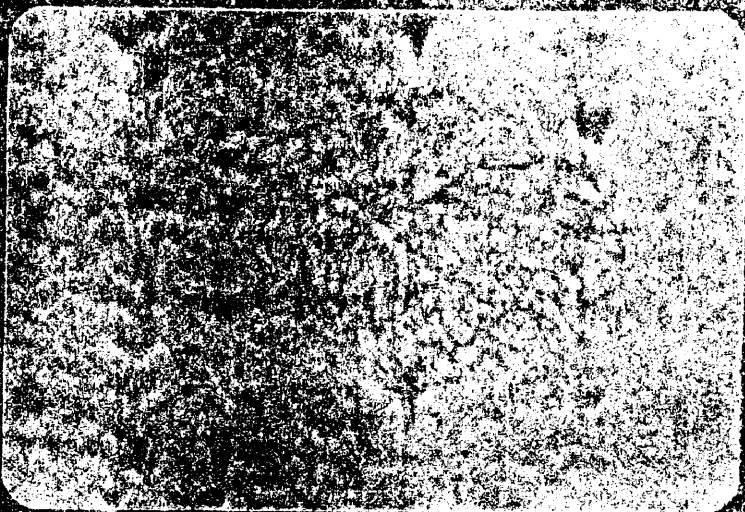
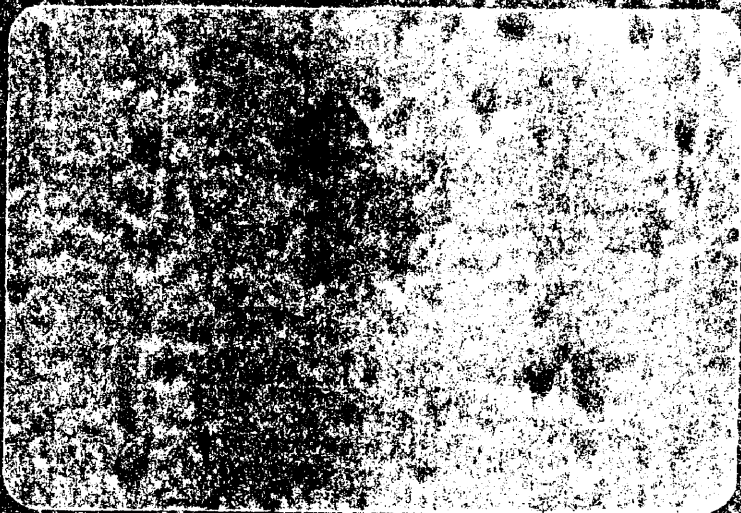
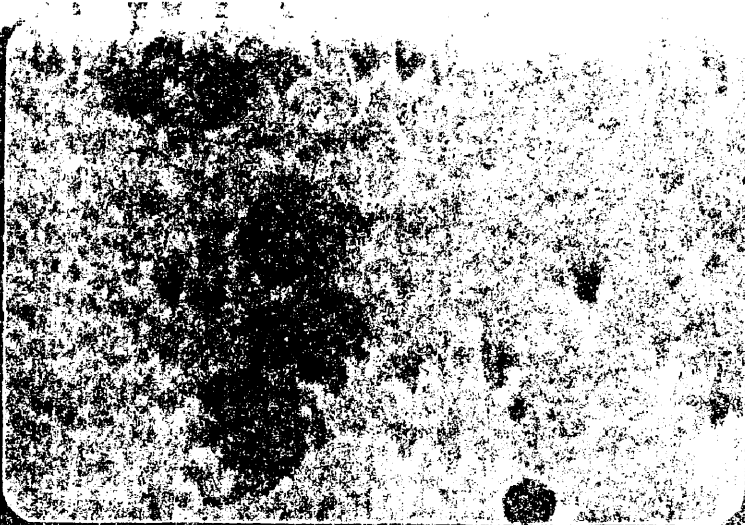
226

TINCION GIEMSA-ADHERENCIAS

Raton inoculado con forma L, sacrificado a los 4 dias.

Raton inoculado con forma L, sacrificado a los 5 dias

Raton inoculado con forma 1, sacrificado a los 5 dias.



221 00

VI. DISCUSSION

MICOPLASMAS

La propiedad más destacable de los micoplasmas es su labi-
lidad, existiendo variaciones morfológicas, como hemos podi-
do comprobar en nuestras experiencias de envejecimiento, cu-
yos resultados nos permiten afirmar que en cultivos líquidos
jóvenes, de 1 a 4 días de incubación, los cultivos de mico--
plasmas presentan en sus tinciones Gram y Giemsa formas fila-
mentosas tenues con gránulos diminutos en su interior, mien-
tras que estos mismos cultivos presentan a los 15 días de in-
cubación, masas de agregados con gránulos de mayor tamaño en
su interior y cuya viabilidad con respecto a los cultivos jó-
venes es menor.

Las mismas variaciones morfológicas se observan al hacer_
tinciones de colonias Dienes de micoplasmas, cuando tienen -
15 o 25 días de incubación, variando la morfología de la co-
lonia, modificando el aspecto característico de "huevo frito"
al ir aumentando el número de granulaciones hasta disgrega--
ción total de la colonia.

El proceso de fijación por el calor para la tinción de --
Gram realizada en micoplasmas produce su desintegración por_
no tener éstos la defensa de la pared, por lo que es neces-
ario prolongar durante varias horas a temperatura ambiente el
proceso de secado y eliminar la acción del calor en este mé-

todo de tinción.

Los colorantes utilizados en las tinciones modifican totalmente la morfología por acciones físico-químicas, por lo que es imprescindible detallar el método de coloración utilizado para cada caso. Así, comprobamos que, en general, con la tinción de Gram los micoplasmas se presentan en filamentos entrecruzados con formas mazudas y onillos, mientras que con la tinción de Giemsa los filamentos son más tenues, existiendo una disgregación morfológica de los elementos intergrantes, lo que nos parece sea debido a la diferencia de presión osmótica, ejercida por los distintos componentes en las sucesivas fases de la coloración, sobre la membrana de estos microorganismos. Por consiguiente, si queremos lograr una observación clara de la morfología, recomendamos la tinción de Gram, como demostramos en las fotos páginas 162, 163 y 164 de la parte experimental.

Estos efectos de alteraciones morfológicas causadas por las variaciones de presión osmótica debidas a las tinciones son semejantes a las observadas en nuestros ensayos de disgregación de micoplasmas en agua destilada o en soluciones de cloruro sódico de distintas concentraciones. En agua destilada permanecen cocos diminutos que solo son capaces de soportar esta acción 48 horas. En las soluciones hipertónicas de cloruro sódico los micoplasmas se presentan como masas agrupadas con tamaño menor de lo morfológico normal, mientras

que en soluciones hipotónicas las formas son mayores, formando una masa de la que parten filamentos; en ambos casos, la modificación osmótica conduce a colonias de micoplasmas con una morfología especial que denominamos "lagunas granulosas". Estas formas cumplen las pruebas de identificación fisiológicas.

Si la acción de la presión osmótica no es muy continuada (24 horas) al resembrar el cultivo recupera su forma típica.

En la observación al microscopio de contraste de fases, vemos que uno de los filamentos de la célula se alarga, apareciendo en su interior zonas opacas (densas) y entre ellas se forman a manera de nudos, dando al conjunto forma de cadena. Tal vez sean estas zonas las que luego se estrangulan y sean capaces de, por separación, dar corpúsculos elementales, tal como lo describen Beveridge y Borrel (1943) y Freund (1958). Morfologías muy diversas puede mostrar un microorganismo y entre ellas formas parecidas a las descritas por Keltom y col. (1960) cuando afirmaban que en los microorganismos de la pleuroneumonía aparecían gránulos Gram positivos. Por su distinta opacidad creemos en la posibilidad de que las formas globosas sean las que conserven en su interior el material genético de la bacteria.

El frío produce en los micoplasmas dos tipos de efectos: uno, el que conduce a un retraso en el desarrollo celular (efecto metabólico) y otro, el que afecta a la integridad de

su estructura (variación morfológica).

El primero de ellos es un efecto considerado normal en todos los microorganismos conservados a temperaturas bajas. -- Así, al pasar a medios líquidos la colección de micoplasmas utilizados en nuestro trabajo, que habían estado conservados a -20°C, durante un período de dos años, comprobamos que el viraje de pH de los medios que nos indicaba que su metabolismo progresaba, se retrasaba con relación a los muestras sin conservación en nevera. El número de días era mayor en medios líquidos sin penicilina, que en aquellos a los que se agregó penicilina. Las tinciones de Gram y Giemsa de ambas series de cultivos presentaban también diferencias, siendo en los medios líquidos con penicilina en los que se observaba mayor semejanza con las tinciones de las muestras no conservadas en nevera. En ambos casos los micoplasmas conservaban las pruebas de identificación.

Al pasar estos cultivos líquidos a placa fue donde se observó variación morfológica de sus colonias; se observaron formas irregulares no reconocibles en los micoplasmas procedentes de medios líquidos sin penicilina y resembrados en placas de agar con o sin penicilina. Estas formas irregulares eran como las encontradas por Smith y col. (1957) y que ellos afirmaban estar originadas por bacterias deterioradas, esta modificación morfológica nosotros la denominamos "lagunas granulosas y formas tenues". La modificación permaneció

inalterable durante numerosas resiembras en sus medios específicos para todos los micoplasmas de nuestra colección. Formas que quedan reflejadas en las fotos correspondientes al Mycoplasma oral tipo 1 en la parte experimental, página 167.

En el caso de siembras procedentes de medios líquidos con penicilina a medio sólido con penicilina, las colonias a pesar de no tener una morfología típica de "huevo frito", presentan forma redondeada con bordes bien delimitados. En el caso de Mycoplasma fermentans y del Mycoplasma pneumoniae -- las colonias aparecen como agrupaciones redondeadas con un aro o reborde que las envuelve, destacando que en las sucesivas resiembras toman siempre estas formas. Fotos páginas

Los formas encontradas para Mycoplasmas salivarium, Mycoplasma cepa T, Mycoplasma hominis y Mycoplasma laidlawii, -- son semejantes a las que presentan estos micoplasmas en fase de envejecimiento de su desarrollo normal, por lo que consideramos que su metabolismo está acelerado.

Para evitar estas alteraciones morfológicas, los micoplasmas no deben conservarse durante períodos prolongados de tiempo a -20°C , siendo recomendable resiembras periódicas -- mensuales en medios de cultivo con penicilina pues parece -- que ésta influye en el normal desarrollo de su metabolismo, -- presentando formas morfológicamente típicas.

Nuestros métodos de siembras de cultivos líquidos de mico

plasmas en placas de agar común pueden dar lugar a pensar -- que no es necesaria la utilización de medios sólidos enriquecidos, ya que estos microorganismos crecen sobre agar común con morfologías típicas, pero hemos de considerar que los micoplasmas sembrados están suspendidos en medios líquidos específicos (enriquecidos) y al realizar las siembras por inundación de la superficie de la placa (retirando el sobrenadante al cabo de 15 minutos) estos líquidos impregnan en cantidad suficiente el agar común para proporcionar a los micoplasmas los elementos indispensables. Por ello suponemos que estos componentes ricos no son de cuantía tan necesaria como para obligar a su utilización en las técnicas habituales, -- bastándonos esta lámina de impregnación superficial.

Cultivos abundantes de micoplasmas en medios líquidos específicos pueden crecer con morfología típica en siembras en placas sobre medios de agar normal, siempre que el método -- utilizado para su siembra sea depositado este líquido de crecimiento sobre la superficie.

INDUCCIÓN DE FORMA L.

En el proceso vital un microorganismo adapta sus estructuras y funciones con respecto a su entorno hasta los límites de su capacidad biológica para preservar su viabilidad.

Como observamos en la revisión bibliográfica, muchos han

sido los métodos ensayados de inducción de forma L, existien-
do por ello gran variedad de resultados.

En los ensayos de inducción de forma L de Streptococcus -
viridans por los métodos de difusión, surco o disco, obtene-
mos formas difíciles de determinar en su morfología y número,
coincidiendo con los resultados obtenidos por Abbate y col.-
(1973) para la forma L de Klebsiella. Enterobacter, Pseudomo-
nas, Shigella flexneri, Staphylococcus y Proteus. En estos -
métodos el contacto microorganismos-agente inductor es tan -
escaso que solo se obtienen algunas granulaciones puntifor-
mes ("lagunas granulosas") y al realizar las pruebas de re-
versión, reaparecen inmediatamente las formas de origen. No
son métodos interesantes para utilizar en la inducción por-
que presentan escaso crecimiento y dificultad en el manejo -
para las pruebas de identificación.

Uno de los factores más interesantes para la inducción de
forma L de Streptococcus viridans en medio líquido es el mo-
mento conveniente en el crecimiento del organismo en el que
hay que añadir el agente inductor. Las resiembras en los me-
dios de inducción deben de hacerse con cultivos líquidos de
Streptococcus viridans en su fase logarítmica para obtener -
un mejor rendimiento de obtención de forma L. Este resultado
coincide con el resultado encontrada por Landman y col. - --
(1968) para sus estudios en Bacillus subtilis y MacKay y Tay-
lor (1954) para Haemophilus gallinarum.

La composición del medio es otro factor importante para la obtención de forma L, habiéndose comprobado que el medio Hayflick es el que presenta la composición más idónea. De los resultados obtenidos con caldo nutritivo se desprende la necesidad de un protector osmótico, por lo que éste no es un medio aconsejable. Con los medios Tood-Hewitt y Hayflick en los dos primeros pases, tanto con 6.666U/c.c. como con 13.222U/c.c. de penicilina, se observaron cocos puntiformes abundantes, que al ser sembrados en placa crecían en forma de "lagunas granulosas" manteniendo esta morfología hasta el 12º pase, a partir del cual el crecimiento en placa es más rápido y la morfología de las colonias es pequeña, irregular, tenue, a veces granulosa en su interior, pero que, al quitar el agente inductor volvían a revertir a su forma primitiva, morfología que seguía repitiéndose en sucesivos pases en medio Tood-Hewitt. Sin embargo en el medio Hayflick con 13.222U/c.c. ya en el pase 13º se empezaron a observar formas más delimitadas y ligeramente incrustadas en el agar, tal como habían descrito Chanock y col. (1962). Por lo que el medio Tood-Hewitt se considera de menor rendimiento para la inducción de forma L de Streptococcus viridans. Por otra parte esta aparición de formas más delimitadas en el medio con mayor concentración de penicilina nos muestra una relación entre la morfología y la concentración del agente inductor, como ya indicaban Klieneberger-Nobel (1951), Rubio Huer

tos (1954) e Hijmans y col. (1956).

A lo largo de nuestro trabajo experimental hemos llegado a la conclusión de que para un mayor rendimiento en la obtención de la forma L de Streptococcus viridans es conveniente adoptar al microorganismo, por sucesivos pases a concentraciones crecientes del agente inductor, pues con ello se consigue una morfología más definida. Comprobando que después de 15 pases en medio Hayflick con 6.666U/c.c., seguidos de 15 pases en este mismo medio con 13.222U/c.c. se obtienen formas L fijas o estables, puesto que al resembrar a medios sólidos sin el agente inductor no revierte a la forma bacteriana de origen.

Los resultados obtenidos en la inducción de forma L en medio bifásico son los mismos que los anteriormente descritos, pero con la ventaja de poder observar simultáneamente las colonias sobre la superficie del agar y el crecimiento en el medio líquido, por lo que reduce el trabajo posterior de resiembras a placas. Habiéndose observado además, que las muestras procedentes de diferentes pases, conservadas en este medio, presentaban gran estabilidad, manteniendo su morfología durante 3 meses a 4°C. Por lo que es un medio rápido para la obtención de forma L, y útil para su conservación.

En los trabajos de inducción de forma L "in vivo" por inoculación intraperitoneal de Streptococcus viridans seguida -

de inyección subcutánea de dosis únicas de 1.000U/c.c., -- 2.000U/c.c. y 6.000U/c.c. de penicilina y sacrificio de los animales a las 3 y 6 horas de la inoculación, hemos observado en las tinciones Gram y Giemsa de sangre y líquido de peritoneo, formas filamentosas y estreptococos diminutos que al ser sembrados en placas de agar PPLO crecen de forma tenue, puntiforme, de tal manera que en la siguiente siembra toman forma de colonia típica de Streptococcus viridans. Por lo -- que con estos tiempos de tomo de muestra y dosis de 1.000U/c.c, 2.000U/c.c. y 6.000U/c.c. de penicilino, no se obtiene inducción de forma L.

Si con estas mismas dosis, la toma de muestra se realiza a las 24 horas, las tinciones realizadas con líquido peritoneal y sangre, muestran formas típicas de Streptococcus viridans, lo que demuestra que dichas dosis son insuficientes para lograr la inducción.

Al aumentar la dosis de penicilina a 12.000U/c.c. las formas que se observan a las 3 horas, 6 horas y 24 horas, son semejantes, pues las tinciones efectuadas con dichas muestras presentan en todos los casos filamentos tenues con cocos diminutos entre sus entrecruzamientos. En las tinciones de sangre se ven leucocitos en fase de fagocitosis, fotos páginas 185 y 224, no observándose diferencias en los distintos tiempos de sacrificio. En las pruebas de reversión realizadas con el líquido peritoneal, se observaron formas irregu

lores de tamaño medio semejantes a las encontradas para la forma L en la inducción "in vitro". Pero a las 6 resiembros en agar 0,8 % sin penicilina, las colonias eran de crecimiento de Streptococcus viridans, lo que nos indica que no es suficiente una dosis de 12.000U/c.c. para obtener una forma L estable. Cuadros 189, 190 y 191.

La administración de una 2ª dosis de antibiótico a las 10 horas de la inyección anterior da lugar a formas semejantes tanto en los ratones sacrificados a las 3 como a las 24 horas, cuyas tinciones, de líquido peritoneal y sangre, apenas toman los colorantes, observándose formas tenues pequeñas.

En las pruebas de reversión de estas formas necesitamos 8 resiembros en medio de agar 0,8 % o medio de gelatina, sin penicilina para poder identificar el estreptococo de origen, por lo que coincidimos con Landmann y col. (1968), ya que obtenemos mejor rendimiento en el proceso de reversión de forma L sobre medios de gelatina y medio de agar 0,8 % que sobre medio agar 1,5 % y agar PPL0. Parece ser que el pleomorfismo adopta una forma más definida, lo que hace pensar en un mecanismo puramente físico de protección osmótica, debido a la alteración de su pared.

La inyección de esta nueva dosis de agente inductor en ratones da lugar a forma L que mantiene la estabilidad durante más resiembros en sus pruebas de reversión, pero que no llega a forma L estable de Streptococcus viridans, confirmamos una

semejanza morfológica con las formas obtenidas en los trabajos de inducción "in vitro".

La inoculación intraperitoneal de Streptococcus viridans seguida de inyección subcutánea de 6.000U/c.c. y 12.000U/c.c. de penicilina, en dosis única, produce en los animales la -- formación de una mucosidad sobre las cápsulas suprarrenales_ en la que por tinción de Gram se observan células epitelia-- les y formaciones mucosas con cocos diminutos como detalla-- mos en las fotos del trabajo de inducción "in vivo". En las_ asas del intestino se producen unas serosidades con cocos en tre la materia grasa, que en el caso de las muestras de ra-- tón inoculado con 12.000U/c.c. y sacrificado a las 24 horas, son de mayor tamaño y agregación. Parece ser que estos com-- ponentes grasos protegen de la acción del agente inductor a_ las masas de agregados de cocos y por esto encontramos mayor acumulación de estreptococos, de tal forma que al realizar - la siembra de estos exudados sobre agar PPLD observamos un - gron crecimiento, mientras que los siembras de tejido pulmo-- nar o de hígado no lo presentaron.

La administración de una 2ª dosis de antibiótico da lugar a las mismas formaciones de mucosidad sobre las cápsulas su-- prarrenales y serosidades en las asas del intestino, pero de mayor tamaño que en las observadas en la administración de - uno sola dosis. Las cápsulas suprarrenales están desprendi-- das y los riñones ligeramente inflamados.

Destacamos la pérdida de la propiedad de alfa hemolisis - característico del Streptococcus viridans, en las formas obtenidas en los procesos de inducción "in vitro" e "in vivo", mientras que el resto de las propiedades bioquímicas de identificación se mantienen. Tan solo en el caso de la inducción "in vivo" con dosis de 1.000U/c.c. de penicilina, la alfa hemolisis permaneció, lo que viene a corroborar que esta dosis es insuficiente para dar lugar a forma L "in vivo".

ESTUDIOS PARA COMPARACIÓN DE MICOPLASMAS Y FORMA L INDUCIDA.

La consistencia del agar da lugar a modificaciones morfológicas en el crecimiento tanto de los micoplasmas como en la forma L, siendo el agar de concentración 0,8 % el que da lugar a colonias de mayor tamaño, haciendo más potentes las granulaciones de su interior, disgregándose el conjunto de la colonia más rápidamente en este medio. Parece por tanto que existe una relación entre el tamaño y morfología de la colonia de estos microorganismos con la dureza del agar, demostrándose su penetración hacia el interior del agar a través de los días de incubación.

En este efecto coincidimos con los resultados de Dienes y col. (1968), al afirmar que las propiedades físico-químicas del medio influyen notablemente en el aspecto morfológico de las colonias, haciéndolas a veces indistinguibles cuando am-

bos microorganismos están cultivados en sus medios más idóneos.

La comparación de las fotos, página 194, y los cuadros correspondientes, nos lleva a recomendar la utilización del agar blando en trabajos de laboratorio de diagnóstico, sembrando la placa por inundación con los líquidos de cultivo de forma L y de micoplasmas; y el agar PPL0 y agar 1,5 % para trabajos de experimentación, pues en estos medios el crecimiento presenta una morfología más detallada, mejor posibilidad de manejo para cortes en las tinciones, y la conservación de la colección presenta menor riesgo de contaminación y desecación.

Al observar la influencia de factores como la consistencia del agar y las distintas unidades de penicilina agregadas a los medios de cultivo sobre el aspecto de los cultivos encontramos una escala de acción de estos agentes morfogénicos en los cuadros van desde la observación en tinciones de líquidos de micoplasmas de formas filamentosas con cocos de gran tamaño en su interior (medios con 4.000U/c.c. de penicilina), hasta cocos pequeños apenas coloreables cuando las unidades de penicilina utilizadas son 16.000U/c.c., variaciones que son semejantes a la observada en el proceso de inducción o forma L.

La utilización de un número mayor de unidades de penicilina G sódica que la propuesta por diversos autores, nos mues-

tro la posibilidad de crecimiento de micoplasmas y forma L, a estas dosis superiores aunque se reduce el número de estos microorganismos viables, los que presentan una morfología -- más detallada.

Esta correlación directa entre la concentración de penicilina y la inhibición del crecimiento fue establecida por -- Wright (1967) para cultivos de Mycoplasma neurolyticum. En -- nuestros trabajos esta influencia ha sido notablemente destacada para los cultivos de Mycoplasma fermentans y Mycoplasma laidlawii, como observamos en las fotos páginas 202, 203, 204 y 205.

Las variaciones observadas en las tinciones con micoplasmas y forma L sometidas a la acción de elevadas concentraciones de penicilina y que se manifiestan por una disminución -- en la captación de colorante, puedan deberse a cambios de -- permeabilidad de las membranas bacterianas sometidas al agente inductor.

El suero es un factor necesario para la inducción de forma L de Streptococcus viridans y para el cultivo en medio líquido de micoplasmas, pero su adición a los medios sólidos -- no es imprescindible, tan solo en los cultivos de la forma L dan colonias más definidas, por lo que puede ser aconsejable su utilización, Ladman y col. (1968) obtienen la reversión de la forma L al reducir la concentración de suero en los me --

dios. Observando las fotos, páginas 208,9 vemos la influencia de este factor sobre la morfología de estos microorganismos, en los medios con distintas concentraciones de suero.

Es oconsejable a la vista de la diversidad obtenida en la morfología que se presenta con los distintos medios, elegir el medio que creamos más idóneo para cada trabajo y utilizarle siempre para tener referencia de su morfología, ya que esta morfología (tamaño y aspecto) está en función del medio utilizado.

Las muestras clínicas en las que se van a realizar identificación de micoplasmas y de forma L, se transportan en medios que contienen antibióticos y se conservan a temperatura que pueden dar lugar a inducción a forma L de algunos de las bacterias que les acompañan.

Para la forma L la digitonina disminuye bruscamente la densidad óptica de los cultivos. Concentraciones de 7 μ g. producen una disminución de lectura de densidad óptica, mientras que el efecto de la adición de 240 μ g. de digitonino produce una lectura de densidad óptica superior a la de partida, como observamos en los cuadros y gráficas, por lo que, el crecimiento resulta pues favorecido con la adición de determinadas concentraciones crecientes de digitonino. Esta diferencia que se presenta entre las lecturas de densidad óptica, también se comprueba en las siembras de estos líquidos en placas, disminuyendo o aumentando el crecimiento de for--

mas tenues sobre la superficie de la placa, tal vez este efecto pueda interpretarse como una acción química de la digitonina sobre la membrana celular modificando el metabolismo normal de la célula.

Esta alteración físico-química de la membrana se ha observado también en los micoplasmas, observándose que en estos microorganismos produce una modificación fisiológica, altera la barrera osmótica y las células se vuelven osmóticamente sensibles. Los cambios de permeabilidad hacen variar también las propiedades de tinción características, mostrando como en experiencias anteriores una disminución en la capacidad de fijar los colorantes desapareciendo las formas bipolares y anillos pequeños que aparecían en los cultivos de micoplasmas líquidos, antes de añadir la digitonina.

La acción de la digitonina sobre los Mycoplasmas fermentans y Mycoplasma laidlawii es producir una disminución progresiva del número de microorganismos viables, como observamos en las gráficas de las lecturas de las densidades ópticas. La digitonina actúa de bacteriostático; de tal manera que la capacidad de crecimiento de estos microorganismos se recupera cuando los sembramos nuevamente en sus medios nutritivos específicos, si la resiembra se hace antes de 48 horas. Recuperan sus propiedades de coloración, comprobándose que mantienen en todo el ensayo sus propiedades de identificación.

Las modificaciones observadas tanto en micoplasmas como en forma L por la acción de la digitonina, coinciden con las detalladas por Razin y Argaman (1963) para sus micoplasmas y forma L.

En nuestra parte experimental hemos encontrado el paso de micoplasmas y forma L inducida de Streptococcus viridans o a través de filtros Millipore de poro 0,45 μ m. y 0,22 μ m. y a través de filtros EKA, lo que nos permite afirmar que utilizar el método de filtración para separación de estos microorganismos no es correcto, pues ambos coexistirán en las muestras filtradas.

Así coincidimos con Boven y col. (1968) cuando afirman -- que la filtración a través de filtros depende de las condiciones de cultivo y del proceso de filtrado, pudiendo llegar este método a modificar la morfología de los microorganismos sometidos a esta experimentación.

La presión utilizada para el filtrado puede actuar sobre estos microorganismos que carecen de pared, dando lugar a modificaciones en sus morfologías típicas.

Encontramos que la forma L es muy sensible a la presión ejercida sobre los líquidos de cultivo.

En ninguno de los casos de inoculación intraperitoneal en ratón, con suspensiones de Streptococcus viridans, micoplasmas o forma L inducida, existe patógeno mortal.

"

En tinciones Gram, Dienes, Giemsa y May-Grünwald de líquido peritoneal, realizadas de ratones sacrificados en días sucesivos, observamos las formas típicas de cada microorganismo inoculada, demostrando como Dracch, Schmitt y Slomska - - (1973) la acción bactericida de las células fagocíticas de la sangre de ratón sobre la forma L.

Aumenta el mecanismo de defensa de la sangre, observándose un aumento de fagocitosis y aumento de células mononucleadas. Fotos páginas 226 .

Los cultivos de sus líquidos peritoneal y sangre en placas de agar PPLO, muestran variación morfológica en las formas de crecimiento en los cultivos de los líquidos, con observación de las "lagunas granulosas" (sacrificios del día 1 al 5) en el caso de la inoculación de Mycoplasma fermentans, de tal manera que los líquidos de sacrificio de los días 5 - al 10 presentan en los cultivos en placas formas redondeadas delimitadas.

Las formas procedentes de cultivos de líquidos obtenidos en los ratones inoculados con Mycoplasma laidlawii, son nuevas y redondeadas en todas las observaciones.

Ratones inoculados con suspensiones de Streptococcus viridans presentan en sus tinciones de líquido peritoneal y sangre, así como en los cultivos en placas de estos líquidos, la identificación de este microorganismo sin variación.

Coincidimos con Tulasne al afirmar la posibilidad de re--

-247-

aislamiento de la forma L en el animal, después de varios --
días de inoculación. Nuestros datos coinciden con los encon-
trados por Smitt y col. (1967) en los que mostraron la per--
sistencia de la forma L de dos cepas de Streptococcus del --
grupo A en tejido de ratones sacrificados 25 días después de
la inoculación intraperitoneal, sin llegar a producir la - -
muerte en ellos.

1100

VII. CONCLUSIONES

1) En las tinciones de cultivos en medios líquidos de micoplasmas y Forma L, es necesario prolongar durante varias horas el proceso de secado a temperatura ambiente, para evitar la alteración morfológica que produce en estos microorganismos el calor.

2) El método más recomendable para la tinción de cultivos líquidos de micoplasmas y forma L de Streptococcus viridans es el Gram y la tinción Dienes para las colonias, pues con estos métodos la observación de la morfología es más detallada.

3) Los micoplasmas no deben conservarse durante períodos prolongados de tiempo a -20°C siendo convenientes las resiembras e identificaciones mensuales.

4) El agar común puede utilizarse para cultivos de micoplasmas, siempre que el método de siembra utilizado sea por inundación de la superficie de la placa con el medio líquido específico de crecimiento de micoplasmas.

5) Los métodos de inducción de forma L de Streptococcus viridans por difusión, surco o disco, no resultan interesantes, pues conducen a escaso crecimiento y presentan dificultad en el manejo.

6) El medio Hayflick es el medio líquido más idóneo para la inducción de forma L estable de Streptococcus viridans, - siendo necesario añadir el agente inductor cuando este micro organismo se encuentra en fase de crecimiento logarítmico y adaptarle por sucesivos pases a concentraciones crecientes - del agente inductor.

7) El medio bifásico es un medio rápido para la obtención de forma L no estable de Streptococcus viridans y útil para su conservación, es asimismo idóneo para cultivos de micoplasmas.

8) La utilización de dosis de 1.000U/c.c., 2.000U/c.c. y 6.000U/c.c. de penicilina G sódica en inyección subcutánea - precedida de inoculación intraperitoneal en ratón de Streptococcus viridans son suficientes para la inducción de su forma L no estable "in vivo".

9) Dosis de 12.000U/c.c. dan lugar a forma L no estable, - pero la administración de una segunda dosis de este agente - inductor aumenta el número de resiembras necesarios para encontrar la bacteria de origen.

10) Recomendamos la utilización de agar blando en trabajos de laboratorio de diagnóstico y agar PPL0 ó agar 1,5 % para trabajos de experimentación, pues en estos medios el crecimiento presenta una mejor observación de la morfología y conservación.

11) La adición de 13.222U/c.c. de penicilina G sódica a los medios de cultivo de micoplasmas y forma L de Streptococcus viridans reduce el número de microorganismos viables y los que permanecen presentan una morfología más definida.

12) El suero es un factor necesario para la inducción de forma L de Streptococcus viridans y para el cultivo de micoplasmas en medio líquido, pero no es imprescindible para sus cultivos en medio sólido, sin embargo como las colonias en medios sin suero presentan variaciones morfogénicas con respecto a la forma típica, es necesario que si elegimos un medio sin suero, se observe la morfología de estos microorganismos y se tenga de referencia, pues cada componente de los medios de trabajo conduce a modificación morfogénica.

13) Utilizar el método de filtración para separar micoplasmas de forma L en muestras clínicas no es recomendable, puesto que ambos pasan a través de filtros Millipore de poro - - 0,45 um y 0,22 um y a través de filtros EKA. En el caso de tener que utilizar la filtración para aislamiento de estos microorganismos de otras bacterias, debe de efectuarse la filtración con la ayuda de una jeringa, pues las alteraciones morfológicas son menores que cuando se hace la filtración al vacío.

"

14) La forma L de Streptococcus viridans, el Streptococ--

cus viridans y los Mycoplasma fermentans y Mycoplasma laidla
wii no son patógenos para el ratón, existiendo la posibilidad
de reacislamiento de estos microorganismos en el animal, a --
los 10 días de su inculación intraperitoneal.

R E S U M E N

La finalidad de esta tesis es conocer las características morfológicas de los micoplasmas y la forma L de Streptococcus viridans, dada la frecuente coexistencia de estos microorganismos en muestras patológicas, pudiendo conducir la falta de su localización al fracaso de tratamientos con antibióticos, y por ello a cronicidad y recidiva de procesos infecciosos.

Comenzamos el estudio con una revisión bibliográfica para pasar a un trabajo experimental que dividimos en tres partes: una, primera, dedicada al estudio de los métodos de aislamiento e identificación para cada microorganismo individualmente según las técnicas utilizadas por otros autores; una segunda en la que llegamos a obtener la inducción de forma L de Streptococcus viridans "in vitro" e "in vivo", y una tercera parte, que se dedica a establecer las comparaciones morfológicas de los micoplasmas y la forma L inducida, cuando se les somete a modificaciones en los factores de cultivo de sus medios, que es el objeto de nuestra tesis.

Tras la exposición de los resultados obtenidos, se resumen las siguientes conclusiones:

Los micoplasmas y la forma L de Streptococcus viridans muestran gran sensibilidad a los componentes de las tinciones

y a la acción del calor del proceso de secado de estos medios de observación; igualmente son sensibles a las variaciones de los componentes de sus medios de cultivo por la semejanza de carecer estos microorganismos de la protección de la pared.

Se observa un máximo rendimiento de inducción de forma L de Streptococcus viridans "in vitro" añadiendo el agente inductor en el momento del crecimiento logarítmico del microorganismo, resultando interesante adaptarle por sucesivos pases en concentraciones crecientes al agente inductor, llegando en nuestro trabajo a inducir "in vitro" una forma L estable.

En la inducción "in vivo" en ratón por inoculación intraperitoneal de Streptococcus viridans seguida de inyección subcutánea del agente inductor, se estudia una relación entre las diferentes dosis del agente inductor, los tiempos de sacrificio y los caracteres morfogénicos de la forma L inducida en el laboratorio.

Se determinan las condiciones del método de filtración para separar estos microorganismos de otras bacterias en muestras patológicas.

Se afirma la no patogenia del Streptococcus viridans, de la forma L de Streptococcus viridans y de los Mycoplasma fer

- 10 -

mentans y Mycoplasma laidlawii en ratón, existiendo la posibilidad de reaislamiento de estos microorganismos en el animal, al cabo de 10 días de su inoculación intraperitoneal.

2.1.1.

BIBLIOGRAFIA

ABBATE, G.F., and col. 1973. Studies on L form of bacteria in -
vitro induction and propagation. Inst. Clin. Med. I. Fac.-
Med. Univ. Naples. Italy.

ADLER, H.E.; YAMAMOTO, R., and CORDY, D.R. 1956. The effect of_
certain antibiotic and arsenicals in inhibiting growth of_
pleuropneumonia-like organism isolated from goats and sheep.
Cornell Vet., 46 (2), 206.

ADLER, H.E.; FABRICANT, J.; YAMAMOTO, R., and BERG, J. 1958. --
Symposium on chronic respiratory diseases of poultry. 1. -
Isolation and identification of pleuropneumonia-like orga-
nism of avian origin. Am. J. Vet. Research., 19 (71), 440.

ALMQUIST, E. 1918. Principles of Bacteriology and Immunity, Wi-
lliams & Wilkins Ad., Baltimore.

ALONSO, A.S. 1964. Estudio serológico del género *Mycoplasma*. --
Rev. Patron. Biol. Anim., 8, 33.

BACIGALUPI, B., and LAWSON, J. 1973. Defined Physiological con-
ditions for the induction of the L- form of Neisseria gono-
rrhoeae. J. Bact., 105, 1207.

BARILE, M.F.; YAGUCHI, R., and EVELAND, W.C. 1958. A simplified
medium for the cultivation of pleuropneumonia-like orga- -
nisms and L-forms of bacteria. Amer. J. Clin. Path., 30, 171.

- BARILE, M.F.; BODEY, G.P.; SNYDER, J.; RIGGS, D.B., and GRABOWSKI, M.W. 1966. a) Isolation of Mycoplasma orale from leukemic bone marrow and blood by direct culture. J. natn. - Cáncer. Inst., 36, 155.
- BARILE, M.F.; SCHIMKE, R.T., at RIGGS, D.B. 1966. b) Presence - of the arginine dehydrolase pathway in mycoplasma. J. Bact., 91, 189.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.H.; SHERRIS, J.C., and TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single - disk method. Am. J. Clin. Path., 45, 493.
- BERG, R.L.; WEINBERGER, H., and DIENES, L. 1957. Acute hemorrhagic cystitis. An infection associated with pleuro-pneumonia-like organisms and related to urethritis and prostatitis. Am. J. Med., 22, 848.
- BERGEY'S. Manual of Determinative Bacteriology 8th Ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.
- BEVERIDGE, W.J., and BORREL, A. 1943. Isolation of pleuropneumonia-like organisms from male uretra. Med. J. Austr., 2, -- 479.
- BIBEL, D.J., and col. 1972. Development of Streptococcal L-form colonies. J. Bact. 112, 602.

- BORDET, J. 1910. La morphologie du microbe de la peripneumon_{is} des bovides. Ann. Inst. Pasteur, 24, 161.
- BORIS, M.; TEUBNER, D., and SHINEFIELD, H. 1969. Bacterial Interference with L- forms. J. Bact., 100, 791.
- BORREL, A.; DUJARDIN-BEAUMENTZ, E.; JEANTET, P., and JOUAN, C.- 1910. Le microbe de la peripneumonie. Ann. Inst. Pasteur., 24, 168.
- BRAUDE, A. 1970. Production of bladder stones by L-forms. Ann.- N.Y. Acad. Sci., 174/2, 896.
- BRENNER, S.; DARK, F.A.; GERHARDT, P.; JEYNES, M.H.; KANDLER, O.; KELLENBERGER, E.; KLIENEBERGER-NOBEL, E.; McQUILLEN, K. - RUBIO-HUERTOS, M.; SALTON, M.R.J., and WEIBULL, C. 1958. - Nature, Lond., 181, 1.713.
- BRETT, W. 1969. A filamentous growth of some mycoplasma species of man. Experientia., 25, 1.118.
- BRIDRE, J. et DONATIEN, A. 1923. Le microbe de l'agalaxie contagieuse et sa culture in vitro. C.R. Acad Sci. (Paris) ., -- 177, 841.
- BROWN, G.W.; KING, G., and SUGIYAMA, H. 1970. Penicillin-lysozyme conversion of Clostridium botulinum types a and E into protoplasts and their stabilization as L- form cultures. J. Bact., 104, 1.325.

- BROWN, G.W.; PATE, J.L., and SUGIYAMA, H. 1971. Fine structure_ of Protoplasts and L- forms of Clostridium botulinum types A and E. J. Bact., 105, 1.207.
- CARD, D.H. 1967. PPLO of human genital origin serological clas- sification of strains and antibody distribution in man. -- Brit. J. vener. Dis., 35, 27.
- CARRERE, L. 1952. C.R. Seances. Soc. Biol. 145, 522.
- CARRERE, L.; ROUX, J., et MANDIN, J. 1954. A propos de cicly -- des bacteries: obtention de formes naines viables et fil-- trables en milieu liquide. C.R. Soc. Biol, 2050.
- CIBA Foundation Symposium. 1972. Patogenic Mycoplasmas.
- CLARK, H.F.; GELDREICH, E.E.; JETER, H.L., and KABLER, P.W. -- 1952. The membrane filter in sanitary bacteriology. Publ.- Health. Rep., 66, 951.
- CLARK, H.W. 1965. Sedimentation counting and morphabgy of Myco- plasma. J. Bact., 90. 1.373.
- CLYDE, W.A., and DENNY, F.W. 1968. Infecciones por micoplasmas_ en la infancia. Pediatrics., 40, 669.
- COHN, F. 1876. Untersuchungen Über Bakterien. IV; Beitrage zur_ Biologie der Bacillen, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. 2,249.
- COLE, B.C.; WARD, J.R., et MARTIN, C.R. 1968. Hemolysin and pe- roxide activity of Mycoplasma species. J. Bact. 95, 2022.
- COOPER, P.D. 1954. The association of the penicillin-binding -- component of Staphylococcus aureus with a lipidic fraction. J. Gen. Microbiol., 10, 236.

"

- COOPER, P.D. 1955. The site of action of penicillin: changes in *Staphylococcus aureus* during the first two hours growth in penicillin media. J. Gen. Microbiol., 13, 22.
- CORAO, M.; SERRANO, J.A.; LEAL, J.A.; PUIG, J., y MUÑOZ, E. -- 1974. Aislamiento de membranas de Escherichia coli K 12, - con tamaño de células y sin mureína. Microbiol. Esp., 27,- 283.
- CRAWFORD, Y.E., and KRAYBILL, W.H. 1967. Ann. N.Y. Sci., 143, - 411.
- CHALQUEST, R.R., and FABRICANT, J. 1960. Avian. Dis., 4, 515.
- CHANOCK, R.M.; HAYFLICK, L., and BARILE. 1962. a) Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc. natn. Acad. Sci. USA., 48 (1), 41.
- CHANOCK, R.M.; JAMES, W.D.; TURNER, M.C.; MUFSON, M.A., and HAYFLICK, L. 1962. b) Growth of Eaton PPLO in broth and preparation of complement fixing antigen. Proc. Soc. exp. Bid. Med., 110, 884.
- CHANOCK, R.; DIENES, L.; EATON, M.; EDWARD, D.; FREUNDT, E.; -- HAYFLICK, L.; HERS, J.; JENSEN, K.; LIU, C.; MARMION, B.;- MORTON, H.; MUFSON, M.; SMITH, P.; SOMERSON, N., et TAYLOR-ROBINSON, D. 1963. Mycoplasma pneumoniae proposed nomenda

ture for atypical pneumonia organism (Eaton agent). Science., 140, 662.

DANNIS, D.C., and col. 1970. Serologic studies of Staphylococcal and Streptococcal L forms. Ann. N.Y. Acad. Sci., 174/2, 922.

DEPARIS, M.; NATIVELLE, R., et SARRAZIN, A. 1961. Interet et limites de la technique des hemo-ovocultures dans certaines maladies infectieuses a hemocultures negatives. Bull. et Me. de la Soc. Med des Hop de Paris., 31, 1087.

DIENES, L., et EDSALL, G. 1937. Observations on the L-organism of Klieneberger. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 36, 740.

DIENES, L. 1939. L-type variant in cultures of various bacteria. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 42, 636.

DIENES, L., and SMIT, Y.S. 1942. The significance of the large bodies and the development of L-type of colonies in bacterial cultures. J. Bact., 44, 37.

DIENES, L. 1947. Isolation of type L cultures from Bacteroides with the aid of penicillin and their reversion into the usual bacilli. J. Bact., 56, 445.

DIENES, L., and WEIBERGER, J. 1951. The L-forms of bacteria. Bact. Rev. 15, 245.

"

- DIENES, L. 1956. Similarities between the L- forms of bacteria - and the pleuropneumonia group. Bact. Proc. 84.
- DIENES, L. 1960. Contribution to the morphology of pleuropneumonia-like organisms and L-forms of bacteria. Bact. Proc., - 60, 50.
- DIENES, L. 1963. The morphology of pleuropneumonia-like organisms and bacterial L-forms. Ann. N.Y. Acad. Sci., 108 (2), 375.
- DIENES, L. 1967. a) Morphology and reproductive processes of -- the forms of bacteria. Streptococci and staphylococci. J.- Bact., 93, 693.
- DIENES, L., and BULLIVANT, S. 1967. b) Comparison of the morphology of pleuropneumonia-like organisms and L- forms of bacteria with and electron microscopi. Ann. N.Y. Acad. Sci., - 143 (1), 719.
- DIENES, L. 1967. c) Permanent stained agar preparation of Mycoplasma and of L-forms of bacteria. J. Bact., 93 (2), 689.
- DIENES, L. 1970. Influence of a bacillus on the reversion to -- bacteria in L-forms of H. influenzae and other species. -- Proc. Soc. exp. Biol. Med. In press.
- DIENES, L. 1971. The development of Proteus cultures in the presence of Penicilline. J. Bact., 57, 529.

- DIERK, R.E.; NEWMEN, J.A., and POMEROY, B.S. 1967. Am. N.Y. - - Acad. Sci., 143, 170.
- DINTER, Z.; DANIELSON, D., and BAKOS, K. 1967. Differentiation_ of porcine Mycoplasma strains. J. gen Microbiol., 41, 77.
- DOMERMUTH, C.H.; NIELSEN, M.J.; FREUNT, A.E., and BIRCH-ANDER-- SEN. 1964. Ultrastructure of Mycoplasma species. J. Bact., 88, 727.
- DOWDLE, W.R., et ROBINSON, R.Q. 1964. An indirect hemaglutina-- tion test form diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infec- - tions. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 116, 947.
- DRASCH, G., and SCHMITT-SLOMSKA, J. 1973. Incidence of cellu- - llar and humoral factors on group A Streptococcal L-forms. Ann. Inst Pasteur., 124B, 463.
- EAGLE, H. 1948. Science. 107, 44.
- EATON, M.D.; MEIKELJOHN, G., and VAN HERICKS, W. 1944. Studies_ on the etiology of primary atypical pneumonia. A filtera-- ble agent transmissible to cotton rats, hamsters and chick embryos. J. exp. Med., 79, 649.
- EDWARD, D.G. 1950. Investigation of the biological poperties of organisms of the pleuropneumonia group with suggestion re- - garding of identification of strains. J. Gen. Microbiol., 4, 311.

EDWARD, D.G., et FITZGERALD, W.A. 1954. Inhibition of growth - pleuropneumonia-like organisms by antibody. J. Path., 8, - 23.

EDWARD, D.G.; FREUNDT, E.A.; CHANOCK, R.M.; FABRICANT, J.; HAYFLICK, L.; LEMCKE, R.; RAZIN, S.; SOMERSON, N.L., et WITTLER, R.G. 1967. Recommendations on nomenclature of the order Mycoplasmatales. Science., 155, 1694.

FABRICANT, J. 1958. A reevaluation of the use of media for the isolation of pleuropneumonia-like organisms of avian origin. Avian Diseases., 2, 409.

FALLON, R.J., and WITTESTONE, P. 1969. Isolation, cultivation - and maintenance of mycoplasmas. In Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (ed) Methods in microbiology, vol. 3B. Academic Press Inc., New York.

FERRAN, J. 1897. Comtes Rendus de L'Academie des Scs.

FOY, H.; KENNY, G.; WENTWORD, B.; JOHNSON, W., and GRAYSTON, J. 1970. Isolation of Mycoplasma hominis, I-strains, and cyto megalovirus from the cervix of pregnant women. Amer. J. - - Obstet. Gynec., 106, 635.

FREUNT, E.A. 1958. The Mycoplasmataceae. Munksgaard, Copenhagen.

- FRIBERG, J., and GNARPE, H. 1973. Mycoplasma and human reproductive failure. Am. J. Obstet. Gynec., 116, 23.
- GALLARHER, E.; BRIT, J.; VENER, D. 1970. Genital infection in - young delinquent girls King's. Coll. Hosp., London UK., 46,- 121.
- GARROW, D.H. 1958. A rapid test for the presence of increased - cod agglutinins. Brit. Med. J., 11, 206.
- GILAIN, A., and STADTSBAEDER, S. 1971. Influence de divers facteurs sur l'induction par l'oxaciline des formes L de - -- Staphylococcus aureus. Ann. Inst. Pasteur., 120/5.599.
- GNARPE, H. 1970. Spaeiroplast infections of the urinary tract. - Scand. J. Infect. Dis., 2, 59.
- GNARPE, H., and FRIBERG. 1972. Mycoplasma and human reproductive failure. Am. J. Obstet. Gynec., 114, a) 727; b) 963.
- GRASSET, E., and BONIFAS, V. 1951. Modalites de transformations in formes L in vivo de Proteus vulgaris et d'autres Enterobacteriaceae sous l'action de la penicilline. Ann. Inst. - Pasteur., 88, 651.
- GREGORY, J., and PAYNE, F. 1970. Mycoplasma in the uterine cervix. Amer. J. Obstet. Gynec., 107, 220.

- GUEVARA, I., y AVILA, O. 1977. La Josamicina en las infecciones respiratorias superiores en pediatría. Investg. Med. Intern. vol. 4., 1, 33.
- GUZE, L.B. and KALMANSON, G.M. 1964. a) Science, N.Y., 143:1340.
- GUZE, L.B., and KALMANSON, G.M. 1964. b) Science, N.Y., 146:1299.
- GUZE, L.B. 1968. In "Microbial Protoplasts, Spheroplasts and -- L- forms". (Ed. L.B. Guze). The Williams & Wilkins Co., -- Baltimore.
- LAIDLAW, P.P., and ELFORD, W.J. 1936. A new group of filterable organisms. Proc. Roy. Soc. London., 120, 292.
- LANDMAN, G.E., and GINOZA, H.S. 1961. J. Bact., 81, 875.
- LANDMAN, D.E., and HALLE, S. 1963. J. Molec. Biol., 7, 721.
- LANDMEN, E.; RYTER, A., and FREHEL, C. 1968. Gelatin induced -- reversion of Protoplast of Bacillus subtilis L the bacillus form: Electron microscopic and physical study. Journal of bacteriology. Vol. 96. No. 6, 2154.
- LAVILLAUREIX, J. 1956. Obtencion de formes naines (Formes L) -- des bacteries sur un milieu enrichi en sels minéraux. Ann. Inst. Pasteur., 90, 376.

LEBECH, P.E., and LEBECH, K. 1977. Mycoplasma in the cervix, -- cause of infertility?. Lecture given at the XVIII meeting_ of the Fertility Club of the Nordic Countries, Odense, - - Denmark.

LEMCKE, R.M. 1964. A comparison of various species of mycoplas_ ma by gel diffusion. J. Gen. Microbiol., 35. (3).

LEMCKE, R.M.; PLACKETT, E.; SHAW, J., and MARMION, B.P. 1968. - Immunochemical analysis of Mycoplasma pneumoniae. Proper-- ties of chloroform-methanol extract from M. pneumoniae. J. Exp. Biol. Med. Sci (Aust)., 46, 123.

LEMCKE, R. 1973. Serological reactions of mycoplasmas. Ann.N.Y. Acad. Sci., 225, 46.

LEVADITI, C., et HENRY, J. 1948. Mise en evidence de modifica-- tions morphologiques et tinctoriales des microorganismes_ soumis a l'influence des antibiotiques et des bacteriophages par la methode des decalques. Revue d'Immunologie., 12, 193.

LIEBERMEISTER, K. 1960. Morphology of the PPL0 and L-forms of - Proteus. Ann. N.Y. Acad. Sci., 79, 326.

LIU CHIEN. 1957. Studies isolation atypical pneumonia L. Locali_ zation and cultivation of a virus in chick embryo. J. Exp. Med., 106, 455.

..

- LONGLEY, E.O. 1951. Contagious caprine pleuropneumonia. A Study of the disease in Nigeria. Colonial Research. Publications No 7.H.M. Stationery Pffice, London.
- LOURIA, D.B. 1971. L-Forms, spheroplasts and aberrant forms in chronic sepsis. Adv. Intern. Med., 17, 125.
- HAJNA, A.A., and DAMON, S.R. 1954. Coliform detection in water by a single-step technique using the membrane filter. Public Health. Rep., 69, 58.
- HAROLS, W., y CLACK. 1965. Sedimentation countring and morphology of Mycoplasma. J. Bact., 90, 1373.
- HARWICKS, H.J.; TUPPA, J.B.; PURCELL, R.H., and FEKETY, F.K. -- 1967. Mycoplasma hominis septicemia associated with abortion. Amer. J. Obstet. J. Gynecol., 99, 725.
- HAURODOY, P. 1954. Mecanisme de formation des formes filtrables et invisibles. Ann. Inst. Pasteur., 86, 395.
- HAYFLICK, L. 1965. a) Tissue cultures and mycoplasmas. Texas. -- Rep. Biol. Med. 23. Suppl., 1, 285.
- HAYFLICK, L., and KOPROSKI, H. 1965. b) Nature, Lond., 205,713.
- HAYFLICK, L. et CHANOCK, R.M. 1965. c) Mycoplasma species of -- man. Bact. Rev., 29, 185.

- HAYFLICK, L. 1969. a) The Mycoplasmatales and L-phase of bacteria. Appeltan Century Grofts, New York.
- HAYFLICK, L. 1969. b) The Mycoplasmatales ans the L-phase of -- bacteria. Adited by Leonard Hayphik.
- HENNING, E. 1974. Cultivation and biochemical propietes of bovi ne Mycoplasma and Acholeplasma, Microbiology Abstracys. -- Vol 9 Noll. Nov., 9B. 9178, 3.
- HIJMANS, W., and DIENES, L. 1955. Further observations on L-forms of alpha haemolytic streptococci. Proc. Soc. Expth. - - Biol. Med.,90, 672.
- HORT, E.C. 1917. Proc. Soc.
- HUTCHINSON, D. 1969. Un medio modificado para el aislamiento de Micoplasmas del material contaminado. The Journal of Medical Laboratory Technology. Vol. 26, No2 abril.
- JONES, D.M. 1967. Mycoplasma hominis en el aborto. British. Medical. Journal Num. 5536, 11 febrero.
- KAGAN, J.W. 1971. Isolation and identification of L-forms and - mycoplasma from clinical material. Z. Gesante. Grenzgeb.,- 17, 788.

- KELTON, W.H.; GENTRY, R.F., and LUDWIG, E.H. 1960. Derivation .
of gram positive cocci from pleuropneumonia-like organisms.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 79, 410.
- KLIENEBERGER-NOBEL, E. 1935. The natural occurrence of PPLO in
apparent symbiosis with Streptobacillus molinoformis and
other bacteria. J. Path. Bact., 40, 93.
- KLIENEBERGER-NOBEL, E. 1949. On Streptobacillus moniliformis --
and the filtrability of its L-forms. J. Hyg., 47, 393.
- KNUDSEN, R.B. 1976. Mycoplasmas in humans. Significance of Urea
plasma urealyticum. Health. LabSci., 13, 144.
- KOCH, R. 1876. Die Aetiologie der Milzbrand-krankheit begründet
auf die entwicklungsgeschichte des Bacillus antracis. --
Beitr. Biol. Pflanz., 11, 277.
- KOCHEMASOVA, Z.N. Isolation of L- forms of mycobacteria from --
pathologic material of tuberculosis patients. Probl.Tuberk.,
48, 63.
- KRAYBILL, W.H., and CRAWFORD, Y.E. 1965. A selective medium and
color test for Mycoplasma pneumoniae. Proc. Soc. Exptl. --
Biol. Med., 118, 965.
- KRECCH, U., and MODDE, H. 1966. Estudios sobre la incidencia y
importancia de las infecciones por Mycoplasma pneumoniae.--
Med Alemana, Vol VII, Sep No 9, 509.

- KUNZE, M., and FLAMML, H. 1972. Mycoplasmas and L-forms. Wien -
Klin. Wochenschr., 84, 564.
- MADOFF, S., and DIENES, L. 1958. L-forms from pneumococci. J.--
Bacteriol., 76, 245.
- MARE, C.J., and SWITZER, W.P. 1965. New species: Mycoplasma ---
hyopneumoniae. A causative agent of virus pig pneumonia. -
Vet. Med., 60, 841.
- MARE, C.J., and SWITZER, W.P. 1966. Virus pneumonia of pigs: --
propagation and charecterization of a causative agent. Ann.
J. vet. Res., 27, 1687.
- MARMION, B.P., and GOODBURN, G.M. 1961. Effect of organic gold_
salt on Eaton's primary atypical pneumonia organisms and -
other observations. Nature, Lond., 189, 247.
- MARMION, B.P., and HERS, J.F. 1963. Observations on Eaton prima_
ry atypical agents and analogous problems in animals. Amer.
Rev. resp. Dis., 88, 198.
- MARSTON, J. 1961. J. infect. Dis., 10, 75.
- MARTIN-BOURGON, C.; SANCHEZ, F., y AGUILAR, A. 1973. Aislamien-
to de cepas T de micoplasmas en muestras vaginales de en--
fermas obstétricas y ginecológicas. Acta Gin, Vol. XXIV, -
409.

McGEE, Z.A.; ROGUL, M., and WITTLER, R.C. 1967. Ann. N.Y. Acad. Sci., 143, 21.

MELLON, R.R. 1925. Studies in microbic heredity.1: Observations on a primitive form of sexuality (Zygospore formation) in the colontyphoid group. J. Bact., 10, 481.

METSNIKOFF. 1888. Virchow's Arch.

MINCK, R. 1950. Obtention de formes L a partir des vibrions cholériques Propriétés pathogènes. Application à la protection des souris contre la maladie expérimentale. Compt rend., - 251, 386.

MINCK, R., et MINCK, A. 1951. Obtention de formes naines (formes L) à partir d'une souche de vibron cholérique soumise à l'action de la pénicilline. C.R. Soc. Biol., 145. 927.

MINCK, R. 1953. a) Recherches sur l'origine des organismes du type de la péripneumonie trouvés dans les organes génitaux - de la femme. Compt. rend., 236, 250.

MINCK, R. 1953. b) L-forms of bacteria and pleuropneumonia-like organisms. Internat Congr. Microbiol. Proc. Sixth., 1, 61.

MINCK, R. 1955. L-forms of bacteria and pleuropneumonia-like organisms. Internat Congr. Microbiol. Proc. Sixth., 1, 149.

- MINCK, R., et KIRN, A. 1960. Rôle des organismes du groupe de -
la péripneumonie des bovidés (PPL0) en pathologie humaine.
Sem. Hôp. Paris. (Path/Biol)., 8, 1443.
- MITCHELL, P., and MOYLE, J. 1956. Symp. Soc. gen. Microbiol., -
6, 150.
- MUELAS, M., and ALES, J.M. 1973. Method for detecting mycoplas-
ma and bacterial L-form colonies in relief with an ordinary
light microscope by means of oblique light. Applied Micro-
biol., 25, 484.
- NAGELI, C. 1876. Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den
Infect un der Gesund. Flege.
- NATIVELLE, R.; DEPARIS, M., and SARRAZIN, A. 1961. Repercussions
pratiques de la connaissance des formes L et du cycle L --
des bacteries (en particulier pour les maladies D'Osler a_
hemoculture negative). Rev. du Practicien., 11, 1877.
- NEIMARK, H.C., and PENE, J.J. 1965. Proc. Soc. exp. Biol. Med.,
118, 517.
- NOCARD, ROUX., DUJARDIN., and SALEM. 1898. Le microbe de la - -
peripneumonie. Ann. Inst. Pasteur., 12, 240.
- NONNET, M.P. 1963. Formes L organismes PPL0. Intérêt pour le --
clinicien. Lyon Med., 15, 1045.

- PEASE, P. 1963. Bacterial origin of certain viruses: identity - of the Eaton agent with Streptococcus MG. Nature (London)., 197, 1132.
- PEASE, P. 1965. The antigenic structure of PPL0 (Mycoplasma homi nis) an related bacteria. J. Gen Microbiol., 41, 299.
- PEGRAM, R.C. 1969. Los usos microbiológicos del cloruro de 2,3, 5, trifenil tetrazolio. The Journal. Med Laborat Tchonoly. Vol 26. No 3, 151.
- PEREZ-UREÑA, M.; ESPINOSA, M.; BARASOAIN, I., y PORTOLES, A. -- 1974. Estudio microbiológico de esferoplastos de Pseudo-- mas patógenos producidos por antibiosis a nivel de pared y membrana. Microbiol. Esp., 27, 235.
- PEROL, Y. 1967. Mycoplasma pneumoniae, son rôle en pathologie - humaine. Progrès en pathologie infectieuse, I Vol. Paris.- Flammarion, Ed., 11, 36.
- PETTERSON, O.L.; HAM, T.H., and FINLAND, M. 1943. Science., 97, 167.
- PIERCE, G.H. 1942. Streptobacilles moniliformis its associated L-form and other PPL0. J. Bact., 43, 780.
- PORRES, J.M. 1973. Esferoplastos, protoplastos y forma L bacte- rianas: su posible papel en el proceso infeccioso. Rev. -- Med Univ. Navarra., XVII, 311.

- PURCELL, R.H.; TAYLOR-ROBINSON, D.; WONG, D., and CHANOCK, R.M.
1966. J. Bacteriol., 92, 6.
- RAZIN, S., and ARGAMAN, M. 1963. J. Gen. Microbiol., 30, 155.
- RAZIN, S., and SHAFER, Z. 1969. Incorporation of cholesterol by
membranes of bacterial L- phase variants; appendix: on the
determination of the L-phase parentage by the electrophore
tic patterns of cell proteins. J. Gen. Microbiol., 53, 327.
- REICH, P.R.; SOMERSON, N.L.; ROSE, J., and WEISSMEN, S. 1966. -
Genetic relatedness among mycoplasmas as determined by -
nucleic acid homology. J. Bact., 91, 153.
- REIMAN, H.A. 1938. J. Amer. med Ass, III, 2377.
- ROBERTS, D.H. 1964. Vet. Rec., 76, 470.
- ROQUEL, M.; Mc GEE, Z.A.; WITTER, R.G., and FALKOW, S. 1965. Nu-
cleic acid homologies of selected bacteria, L- forms and -
mycoplasma species. J. Bact., 90, 1200.
- ROTTA, L.; WALTER.,; KARAKAWA., and RICHARD, M. 1965. Isolation_
of L-forms group A Streptococcus exposed to bacitracina. J.
Bact., 89, 1581.
- RUBIO HUERTOS, M., y MORENO SAN MARTÍN, R. 1953. Obtención y es
tudio de las formas filtrables de Proteus vulgaris. J. Mi-
crobiol., 6, 195.

- RUBIO HUERTOS, M. 1954. Estudio del ciclo "L" y formas filtrables de las bacterias. Premio Ramón y Cajal. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- RUBIO HUERTOS, M.; BELTRÁ, R., y SANTAOLALLA, M. 1972. Ultrastructure of stable L-phase of Agrobacterium tumefaciens -- causing tumor formation in Phaseolus vulgaris. L. Microbiol. Esp.
- SABIN, A. 1941. The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group. Bacteriol. Rev., 5,1.
- SALTON, M., and HORNE, R. 1951. Studies of the bacterial cell wall. II Methods of preparation and some properties of cell walls. Biochim et Biophys. Acta., 7, 177.
- SALTON, M. 1953. a) Cell structure and the enzymic lysis of bacteria. J. Gen Microbiol., 9, 512.
- SALTON, M. 1953. b) Studies of the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some Gram-positive and -- Gram-negative bacteria. Biochim et Biophys. Acta., 10, 512.
- SCHMITH, J.; SLOMSKA, E.; SACQUET., and CARAVANO, R. 1967. Group A Streptococcal L-forms. L. Persistence Among. Inoculated Mice. J. Bact., 93, 451.
- SEIFFERT, G. 1937. Filtrable Mikroorganismen in der freien. -- Natur, Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. Beiheft., 140, 168.

- SHARP, J. 1954. L-colonies from hemolytic streptococci: new ---
tecchnic in the study of L-forms of bacteria. Proc. Soc. -
Exp. Biol. Med., 87, 94.
- SHEPARD, M.C. 1956. T-form colonies of pleuropneumonia-like organisms
J. Bact., 71, 362.
- SHEPARD, M., and LUNCEFORD, C. 1967. J. Bact., 93, 1513.
- SHEPARD, M. 1969. The Mycoplasmatales and the L-phase of bacte-
ria. Ed: Hayflick, New York.
- SHOETENSACK, H. 1934. Pure cultivation of the filtrables virus_
isolated from canine distemper. Kitasato. Arch., 11, 277.
- SMITH, P.; PLEIPLES, D., and MORTON, H. 1957. Conversi3n of ---
pleuropneumonia-like organisms to bacteria. Proc. Soc. Exp.
Biol. Med., 96, 550.
- SMITH, C.; CHANOCK, R.; FRIEDEWALD, W., and ALFORD, R. 1967. --
Ann. New York. Acad. Sci., 143, 471.
- SMITH, P. 1971. The Biology of Mycoplasmas. Academic Press. New
York.
- SOHIER, R. 1964. Diagnostic des maladies a virus. Editions Med_
Flammarion., 423.
- SOMERSON, N., and MORTON, H. 1953. Reduction of tetrazolium - -
salts by pleuropneumonia-like organisms. J. Bact., 65,245.

- SOMERSON, N.; WALLS, B., et CHANOCK, R. 1965. Hemolysin of Myco
plasma pneumoniae tentative identification as a peroxide.-
Science., 150, 206.
- SOMERSON, N.; REICH, P.; CHANOCK, R., and WEISSMAN, S. 1967. Ge
netic differentiation by nucleic acid homology.III. Rela--
tionship among Mycoplasma, L-forms, and bacteria. Ann. N.Y.
Acad. Sci., 143, 9.
- SOMPOLINSKY, D.; SOLOMON, F.; ELKINA, L.; WEINRAUB.; BUROVSKY,-
L., and CASPI, E. 1975. Infections with mycoplasma and bac
teria in induced midtrimester abortion and fetal loss. Am.
J. Obstet. Gynec., 121, 610.
- STRAY-PEDERSEN, B.; JANENG,; MANNSAKER-REIKVAN, T. 1978. Uteri-
ne T- mycoplasma colonization in reproductive failure. Am.
J. Obstet. Gynec., 130, 307.
- SWITZER, W.P. 1955. Studies on infectious rhinitis of swine.IV.
Characterization of a pleuropneumonia-like organism isola-
ted from the nasal cavities of swine. Amer. J. vet. Res.,-
16, 540.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; SOMERSON, N.L.; TURNIER, H., and CHANOCK,-
R.M. 1963. Serological relations among human aschown by com
plement fixation and gel diffusion. J. Bact., 85, 1261.

TAYLOR-ROBINSON, D.; LUDWIG, W.M.; PURCELL, R.; MUFSON, et CHA-
NOCK, R. 1965. Significance of antibody to Mycoplasma homi
nis type I as measured by indirect hemagglutination. Proc.-
Soc. Exp. Biol. New York., 118, 1073.

TAYLOR-ROBINSON, D.; ADDE, J., and GOODWING, C. 1969. Compari--
son of techniques for the isolation of T-strain mycoplas--
mas. Nature., 222, 274.

THEODORE, T.S.; KING, J.G.; TULLY, J., and COLE, R. 1970. Polya-
crimide gel patterns of microorganisms, In. C. J. Corum --
(ed), Development in industrial microbiology, Vol II, Gara-
mond/Pridemark Press, Baltimore., 122.

THEODORE, T. 1971. Polyacrimide gel identification of bacterial
L- forms and mycoplasma species of human origin. Applied -
Microbiol., 21, 272.

TULASNE, R. 1950. Nouvelles observations sur les formes L des -
bacteries Reproduction des formes L. Processus de la rever-
sion des formes L en formes bacteriennes normales. C.R. --
Soc. Biol., 145, 429.

TULASNE, R. 1951. Les formes L des bacteries. Rev Immunol., 15,
4, 223.

TULASNE, R., et BRINGMANN, G. 1952. Donneés nouvelles apportées
par la microscopie electronique sur la morphologie des for-
mes L des bacteries, Revue d'immunologie., 16, 325.

- TULASNE, R. 1953. Le cycle L et les formes naines des bacteries. VI. Congr. Int. Microb., Simposium, Roma.
- TULASNE, R., and BRISOU, J. 1955. Les pleuropneumonies. Taxonomie des "pleuropneumonia-like organisms" et les formes L. Ann. Inst. Pasteur., 88, 237.
- WEIBULL, C. 1953. The isolation of protoplast from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bacteriol., 66, 688.
- WEISSENBACKER, E.R. 1969. Demostración de Micoplasmas en el carcinoma de útero. Medizinische Klinik 160, 92. Diciembre -- 1974. Ed. alemana. 1969.
- WENZEL, P.; HENDLEY, J.; DODD, K, Wand. GWALTNEY, M. 1976. Comparison of Josamycin and erythromycin in the therapy of Mycoplasma pneumoniae Pneumonia. Antimicrob Agents and Chemotherap Vol 10 No 6, 899.
- WILSON, C.D. 1971. The isolation of L-form of Streptococcus agalactiae from cases of bovine mastitis. Br. Vet. J., 127, - 253.
- WINTERBAUER, R.; GUTMAN, L.; TURCK, R.; WEDGEWOOD, R., and PETERSDORF. 1967. The role of penicillin-induced bacterial variants in experimental pyelonephritis. J. Exp. Med., 125, 607.

- 184 -

- WRIGHT, D. 1967. Nature of penicillin-induced growth inhibition of Mycoplasma neurolyticum. J. Bact. Vol 93., 1, 185.
- WYRICK, P.B., and GOOPER, H. 1971. a) Growth of Streptococcal - protoplast and colonies en membrane filters. J. Bacteriol., 105/2, 646.
- WYRICK, P.B., and GOOPER, H. 1971. b) Filterability of Streptococcal L- forms. J. Bacteriol., 105/2, 284.
- WYRICK, P.B.; McCONNELL, M., and ROGERS, H. 1973. Genetic transfer of the stable L-form state to intact bacterial cells.- Nature., 244, 5417.
- XALABARDER, C. 1953. La biología del My.tuberculosis estudiada con el microscopio electrónico. Publicaciones del Inst. antituberculoso "Francisco Moragas", Barcelona.
- ZSIGMONDY, and BACHMANN. 1918. Über neue Filter. Z. anorg. u. - allgen. Chem., 103, 119.

